

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Magdaléna Pavlíková

Identifikace biosyntetických shluků v půdních izolátech aktinomycet

The identification of biosynthetic clusters in the soil isolates of actinomycetes

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Lucie Najmanová, Ph.D.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 13.8.2015

.....
Magdaléna Pavlíková

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své školitelce Mgr. Lucii Najmanové, Ph.D. za vedení práce, cenné rady a připomínky. Velký dík patří i dalším kolegům z laboratoře biologie sekundárního metabolismu za veškerou pomoc a přátelské pracovní prostředí, děkuji obzvláště Mgr. Tomáši Bakalovi, dále Mgr. Stanislavu Kadlčíkovi za poskytnutí primerů a Zdeňku Kameníkovi za vhled do vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie a pomoc při řešení biosyntézy limazepinů.

Dále děkuji laboratoři environmentální mikrobiologie, Bc. Petře Havlíčkové za pomoc při přípravě sekvenační knihovny pro metodu Illumina a Mgr. Tomáši Větrovskému za assembling sekvencí.

V neposlední řadě děkuji všem přátelům, příteli Kubovi a rodině za to, že mě po celou dobu studia chápali a podporovali.

Tato práce vznikala v letech 2013 – 2015 v Laboratoři biologie sekundárního metabolismu, Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky, v.v.i. s finanční podporou grantu OPVK (registrační číslo CZ.1.07/2.3.00/20.0055). Díky finanční podpoře „Nadace Českého literárního fondu“ a „Nadání Josefa, Marie a Zdenky Hlávkových“ mi bylo umožněno zúčastnit se vědecké konference „International Symposium on the Biology of *Actinomycetes*, Turecko 2014“.

Abstrakt

Pyrrolobenzodiazepiny (PBD) jsou sekundární metabolity s významnou protinádorovou aktivitou, produkované převážně mikroorganismy rodu *Streptomyces*. Klíčovou roli v biosyntéze PBD hrají enzymy neribosomální peptidové synthetasy, které zprostředkovávají kondenzaci dvou prekurzorů, anthranilátové podjednotky a prolinu, nebo jeho derivátu, za vzniku tricyklické molekuly PBD, která může být dále substituována. Dosud bylo publikováno 5 genových shluků pro biosyntézu PBD. Cílem této práce bylo identifikovat a charakterizovat biosyntetický shluk (případně shluky) pro biosyntézu PBD limazepinů. Producent limazepinů jako jediný dosud identifikovaný kmen produkuje zároveň PBD s hydroxylem v pozici C9 i PBD v této pozici nehydroxylované. Dle doposud publikovaných výsledků je v biosyntéze PBD hydroxylovaných v pozici C9 zapojena kynureninová dráha. Biosyntéza PBD v této pozici nehydroxylovaných využívá dráhu chorismátovou. Dle publikovaných dat navíc PBD produkované tímto kmenem inkorporují tři různé deriváty prolinu, z nichž dva nebyly u jiných PBD dosud popsány.

Na základě výsledků této diplomové práce bylo revidováno taxonomické zařazení produkčního mikroorganismu i spektrum reálně produkovaných limazepinů. Byl identifikován jediný limazepinový biosyntetický shluk, který byl sekvenován, charakterizován a byla také navržena biosyntetická dráha. V biosyntéze limazepinů je překvapivě zapojena dráha odvozená od chorismátové, přestože je majoritně inkorporován 3-hydroxyanthranilát, prekurzor látek hydroxylovaných v pozici C9. Mezi šesti popsányými PBD biosyntetickými shluky se tedy jedná již o třetí variantu této části biosyntetické dráhy. Dále bylo odhaleno evoluční propojení biosyntézy PBD s biosyntézou látek phenazinů.

Klíčová slova

Pyrrolobenzodiazepiny, limazepiny, biosyntetická dráha, chorismátová dráha, kynureninová dráha, neribosomální peptidová synthetasa, phenaziny

Abstract

Pyrrolobenzodiazepines (PBDs), predominantly produced by microorganisms from the genus *Streptomyces*, belong to a group of secondary metabolites with significant antitumor activity. A key role in the biosynthesis of PBDs have nonribosomal peptide synthetases, which catalyze the condensation of anthranilate subunit with prolin or proline derivative resulting in tricyclic PBD molecule, which can be subsequently further substituted. Five biosynthetic gene clusters have been published yet. The aim of this diploma thesis was to identify and characterize the biosynthetic gene cluster (or clusters) for the biosynthesis of PBDs limazepines. The producer of limazepines is the only yet identified strain, which produces both the PBDs hydroxylated at C9 position and compounds unsubstituted in this position simultaneously. According to already published data, in the biosynthesis of PBDs hydroxylated at position C9 the kynurenine pathway is involved, while the biosynthesis of the C9 unsubstituted PBDs employs the chorismate biosynthetic pathway. Moreover, according to the previously published data, the PBDs produced by this model strain incorporate three different proline derivatives, two of them being described as a structural part of a PBD molecule for the first time.

Based on the results of this diploma thesis, the taxonomical assignment of the producing microorganism was revised as well as the spectrum of produced limazepines. A single limazepine biosynthetic gene cluster was identified, sequenced and characterized and the biosynthetic pathway was proposed. Surprisingly, in the biosynthesis of limazepines, where mainly the 3-hydroxyanthranilate precursor is condensed to give C9-hydroxylated final compounds, the biosynthetic pathway derived from the chorismate on eis involved. In the group of six already described PBD biosynthetic clusters, it thus represents the third variant of this biosynthetic pathway. The evolution linkage of the biosynthesis of PBDs and phenazines was revealed.

Keywords

Pyrrolobenzodiazepines, limazepines, biosynthetic pathway, chorismate pathway, kynurenine pathway, nonribosomal peptide synthetase, phenazines

Obsah

1. ÚVOD.....	9
2. PŘEHLED LITERATURY	11
2.1 Význam pyrrolobenzodiazepinů	11
2.2 Struktura PBD	13
2.3 Biosyntéza PBD	17
2.3.1 Biosyntéza APD podjednotky	19
2.3.2 Biosyntéza anthranilátové podjednotky	24
2.3.2.1 Kynureninová dráha	24
2.3.2.2 Chorismátová dráha	26
2.3.3 Kondenzační reakce, NRPS	28
2.4 Limazepiny	30
3. CÍLE PRÁCE	32
4. MATERIÁL A METODY.....	33
4.1 Materiál	33
4.1.1 Bakteriální kmeny a vektory.....	33
4.1.2 Enzymy a chemikálie	34
4.1.3 Kultivační média	36
4.1.4 Pufry, roztoky a standardy	37
4.1.5 Komerční soupravy.....	38
4.1.6 Oligonukleotidy	39
4.1.7 Software	40
4.2 Metody	41
4.2.1 Kultivace bakterií	41
4.2.1.1 Kultivace buněk <i>Micrococcus</i> ICBB 8177 pro analýzu pomocí UHPLC-UV-MS	41
4.2.1.2 Kultivace buněk <i>Micrococcus</i> ICBB 8177 pro izolaci chDNA	41
4.2.1.3 Kultivace buněk <i>E. coli</i> JM109	41
4.2.1.4 Kultivace buněk <i>E. coli</i> VCS 257	42
4.2.2 Identifikace limazepinů metodou UHPLC-UV-MS.....	42
4.2.3 Transformace buněk <i>E. coli</i> JM109	43
4.2.4 Izolace chromozomální DNA (chDNA).....	44
4.2.5 Izolace kosmidové DNA vazbou na aktivované sklo.....	45
4.2.6 Příprava kosmidové knihovny (SuperCos I, Cosmid Vector Kit)	46
4.2.6.1 Příprava ligační směsi	46
4.2.6.2 Ligace opracovaného vektoru SuperCos I a štěpené chDNA	47
4.2.6.3 Pakážování a transfekce ligační směsi	47

4.2.6.4 Zamrazení kosmidové knihovny jako glycerolové konzervy	48
4.2.6.5 DNA elektroforéza v agarosovém gelu.....	48
4.2.6.6 Izolace fragmentů DNA z agarosového gelu.....	49
4.2.6.7 Přečišťování kosmidové DNA	49
4.2.7 Polymerasová řetězová reakce (PCR).....	49
4.2.8 Prohledávání (screening) knihovny	52
4.2.9 Sekvenování DNA	52
4.2.9.1 Sekvenování Sangerovou metodou	52
4.2.9.2 Sekvenování metodou Illumina	52
4.2.10 Bioinformatická analýza	53
4.2.10.1 Analýza genomového shluku pro biosyntézu limazepinů	53
4.2.10.2 Analýza genomu producenta limazepinů	54
5. VÝSLEDKY	56
5.1 Ověření identity kmene <i>Micrococcus</i> sp. ICBB 8177	56
5.1.1 Identifikace limazepinů metodou UHPLC-UV-MS.....	56
5.1.2 Ověření taxonomického zařazení producenta limazepinů	59
5.2 Izolace a identifikace shluku genů pro biosyntézu limazepinů	60
5.2.1 Příprava kosmidové knihovny	60
5.2.1.1 Příprava chDNA (izolace chDNA a parciální štěpení)	60
5.2.1.2 Příprava kosmidové DNA a vlastní konstrukce knihovny	62
5.2.2 Zhodnocení pokrytí genomu kosmidovou knihovnou.....	64
5.2.3 Testování přítomnosti limazepinového biosyntetického shluku v kosmidové knihovně	65
5.2.4 Vyhledávání limazepinového biosyntetického shluku v kosmidové knihovně	66
5.2.5 Identifikace inzertu vloženého do vektoru SCLim	68
5.3 Sekvenční analýza limazepinového biosyntetického shluku	69
5.3.1 Hranice genomového shluku pro biosyntézu limazepinů	69
5.3.2 Analýza genů limazepinového biosyntetického shluku	71
5.3.3 Návrh dráhy biosyntézy limazepinů	76
5.4 Sekvence genomu producenta limazepinů (<i>Micrococcus</i> sp. ICBB 8177) .	78
5.4.1 Analýza genomových shluků pro biosyntézu sekundárních metabolitů v genomu <i>Micrococcus</i> sp. ICBB 8177	78
6. DISKUZE.....	79
6.1 Taxonomické zařazení producenta limazepinů	79
6.2 Analýza produkce limazepinů (metodou UHPLC-UV-MS)	80
6.3 Sekvenční analýza limazepinového biosyntetického shluku	82

6.3.1 Hranice genového shluku pro biosyntézu limazepinů	82
6.3.2 Analýza genů limazepinového biosyntetického shluku	84
6.3.2.1 Kondenzační reakce	84
6.3.2.2 Biosyntéza APD podjednotky	86
6.3.2.3 Biosyntéza anthranilátové podjednotky limazepinů	87
6.3.2.4 Ostatní geny	92
7. SOUHRN.....	95
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	96

Seznam použitých zkratk

A-doména	adenylační doména
ADIC	2-amino 2-deoxyisochorismát
APD	derivát 4-alkyl-Lprolinového typu
AS	anthranilát synthasa
BSA	hovězí sérový albumin
c-di-GMP	cyklický di-GMP (diguanylát)
CIP	alkalická fosfatasa z telecí střešní sliznice
DAHP synthasa	3-deoxy-D-arabino-heptulosonát-7-fosfát synthasa
DHHA	kyselina 2,3-dihydro-3-hydroxyanthranilová
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTP	deoxynukleotid trifosfát
EDTA	ethylendiaminotetraoctová kyselina
EtBr	ethidium bromid
HGT	horizontální genový přenos
chDNA	chromosomální DNA
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
NRPS	neribosomální peptidová synthetasa
ORF	otevřený čtecí rámec
PBD	pyrrolobenzodiazepin
PCR	polymerasová řetězová reakce
PKS	polyketid synthasa
PPL	4-propyl-L-prolin
SAM	S-adenosyl methionin
TDO	tryprophan 2,3-dioxygenasa
UHPLC-UV-MS	Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (ultra high performance chromatography) spojená s UV detekcí a hmotností spektrometrií (MS)

1. ÚVOD

Pyrrolobenzodiazepiny (PBD) patří do perspektivní a potenciálně klinicky využitelné skupiny bioaktivních látek (sekundárních metabolitů), produkovaných v naprosté většině případů mikroorganismy rodu *Streptomyces*. PBD jsou tricyklické molekuly, v jejichž biosyntéze hrají zásadní a nezastupitelnou roli enzymy neribosomální peptidové synthetasy (NRPS), které zprostředkovávají kondenzaci dvou aminokyselinových prekurzorů, anthranilátové a zpravidla APD (4-alkyl-L-prolin derivative) podjednotky za vzniku tricyklické molekuly PBD.

Tato skupina sekundárních metabolitů se vyznačuje slabým antimikrobiálním účinkem, daleko významnější je ale jejich protinádorová aktivita (Gerratana, 2012). Významný protinádorový účinek vede širokou vědeckou komunitu ke studiu této skupiny látek. Kromě vyhledávání nových mikroorganismů produkujících dosud nepopsané biologicky aktivní látky bývají již známé PBD chemicky modifikovány za účelem zlepšení jejich biologických vlastností. Do popředí se také dostává bioinformatická analýza a cílené vyhledávání genů biosyntézy sekundárních metabolitů v genomech či metagenomech, zejména díky neustálému zlevňování a zlepšující se dostupnosti sekvenování.

Uspořádání genů biosyntézy sekundárních metabolitů v kompaktních shlucích umožňuje snadnou izolaci daného biosyntetického shluku, čímž může být docíleno heterologní produkce dané látky ve vhodném hostiteli. Analýza biosyntetických shluků a porozumění biosyntéze bioaktivních látek umožňuje produkci modifikovaných látek s lepší biologickou aktivitou díky cíleným zásahům do genomů. Aktuálním tématem ve studiu PBD je rovněž mutasyntéza látek s lepšími biologickými vlastnostmi (Yonemoto *et al*, 2012).

Do dnešního dne bylo sekvenováno, popsáno a publikováno 5 genových shluků pro biosyntézu PBD anthramycinu, sibiromycinu, tomaymycinu, porothramycinu a tilivallinu (Hu *et al*, 2007; Li *et al*, 2009a; Li *et al*, 2009b; Najmanova *et al*, 2014; Schneditz *et al*, 2014). Cílem této práce bylo identifikovat, izolovat a charakterizovat další biosyntetický shluk PBD, zodpovědný za biosyntézu limazepinů.

Producent limazepinů, *Micrococcus* sp. ICBB 8177 (Fotso *et al*, 2009), představuje pozoruhodný model z hlediska evoluce PBD. Nejzajímavější je schopnost produkovat paralelně PBD hydroxylované na uhlíku v pozici 9 (Limazepin C, D a E), i látky v této pozici nehydroxylované (Limazepin F). Pro každý tento typ PBD byla totiž v literatuře popsána speciální biosyntetická dráha. 3-OH-anthranilová kyselina, prekurzor PBD hydroxylovaných v pozici C9, je syntetizována kynureninovou dráhou, zatímco kyselina anthranilová, prekurzor PBD bez hydroxylu v pozici C9, je syntetizována dráhou chorismátovou (Li *et al*, 2009a; Li *et al*, 2009b). Dosud nebyl popsán bakteriální druh, který by pro biosyntézu PBD využíval obě popsané biosyntetické dráhy zároveň, stejně tak nebyla popsána taková dráha, která by umožňovala biosyntézu PBD v pozici C9 hydroxylovaných i nehydroxylovaných.

2. PŘEHLED LITERATURY

2.1 Význam pyrrolobenzodiazepinů

Pyrrolobenzodiazepiny (PBD) jsou řazeny do širší skupiny látek benzodiazepinů, kam patří známý a často v klinické praxi využívaný diazepam, určený pro zklidnění a mírnění úzkostných stavů (sedativum a anxiolytikum). Dále je do skupiny benzodiazepinů řazeno minimálně 50 dalších klinicky využívaných psychoaktivních látek s obdobnými účinky určených mimo jiné také k terapii abstinenčního syndromu alkoholiků, nespavosti, epilepsie a ke zmírnění svalových křečí (Gerratana, 2012; Junior *et al*, 2015).

Vlastní PBD byly objeveny jako sekundární metabolity přirozeně produkované některými mikroorganismy řádu *Actinomycetales*. PBD jsou látky se slabým antimikrobiálním účinkem, daleko významnější je jejich protinádorová aktivita (Gerratana, 2012).

Účinek PBD je zprostředkován kovalentní vazbou do malého žlábků DNA, konkrétně ke guaninu (Kohn *et al*, 1974; Petrussek *et al*, 1981), přičemž je preferován sekvenční motiv purin-guanin-purin (Hurley *et al*, 1988). Vazbou PBD je negativně ovlivněna syntéza nukleových kyselin, tedy replikace a transkripce (Horwitz, 1971; Horwitz *et al*, 1971). Komplexy PBD s DNA zabraňují vazbě transkripčních faktorů (Jackson *et al*, 2014; Kotecha *et al*, 2008) a přímo také narušují aktivitu RNA polymerázy (Puvvada *et al*, 1997).

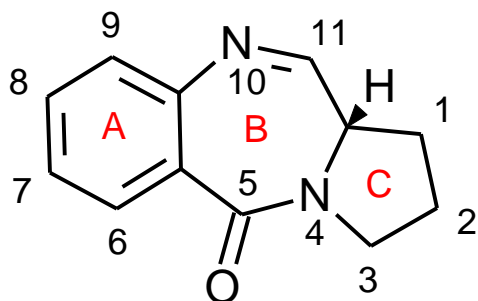
První objevenou látkou tohoto typu byl anthramycin v roce 1963 (Tendler & Korman, 1963), od té doby bylo popsáno přibližně dvacet přirozeně se vyskytujících látek ze skupiny PBD, produkovaných mikroorganismy (Gerratana, 2012).

Vzhledem ke zmiňovaným klinicky významným a potenciálně využitelným vlastnostem je snaha nejen o objevování nových přirozených látek. Daleko více PBD bylo syntetizováno chemicky nebo byly známé PBD chemicky upraveny. Takovým příkladem jsou PBD dimery, které se často specifitěji a lépe vážou k DNA (Gerratana, 2012). Z této kategorie látek stojí za zmínku zatím nejvýznamnější dimerní PBD, SJG-136 (Hartley *et al*, 2004). Doposud byla dokončena druhá fáze klinických testů (<https://clinicaltrials.gov/show/NCT01200797>). PBD dimery se vyznačují schopností vázat mezi sebou (cross-link) vlákna dvouřetězcové DNA (Thurston *et al*, 1996), stejný

mechanismus účinku má mnoho běžně využívaných preparátů v protinádorové terapii. Ve srovnání s těmito běžnými léčivy, SJG-136 působí rychleji a hlavně dlouhodobě (Hartley *et al*, 2004). Významná biologická aktivita SJG-163, ale i běžných PBD monomerů je pravděpodobně výsledkem snížené schopnosti DNA opravných mechanismů rozpoznávat komplexy PBD-DNA (Clingen *et al*, 2005).

2.2 Struktura PBD

Bakteriální PBD jsou tricyklické molekuly složené z anthranilátového (A), diazepinového (B) a hydropyrrolového kruhu (C) (Obrázek 1).



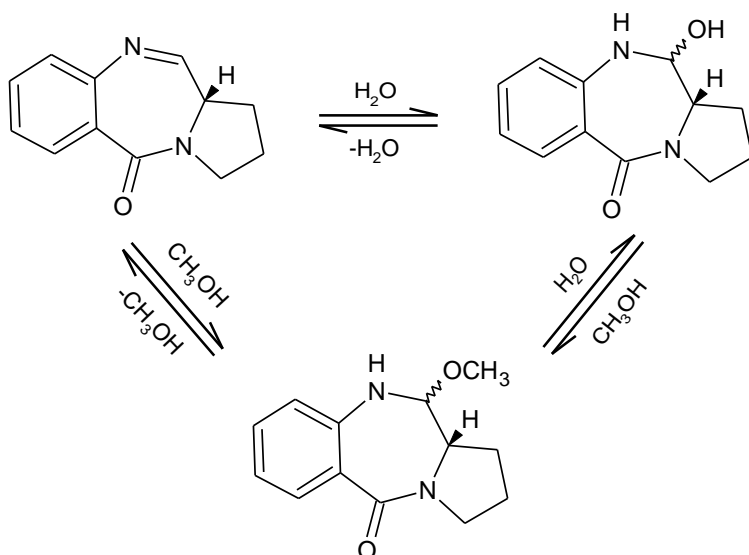
Obrázek 1. Obecné schéma struktury PBD

A-anthranilátový, B-diazepinový, C-hydropyrrolový kruh (Převzato a upraveno Gerratana, 2012)

Všechny kruhy v molekule mohou být substituovány. Chemická různorodost ale i biologická aktivita v rámci skupiny PBD jsou určeny množstvím a typy substituentů anthranilátového, hydropyrrolového i diazepinového kruhu.

Zvláštní pozici mezi substituenty mají ty na uhlíku v pozici 11. Na základě přítomnosti rozdílných substituentů můžeme sledovat PBD ve 3 různých formách (imino, methoxy, hemiaminal). Tyto formy vznikají jako důsledek odlišných podmínek při skladování nebo chemické analýze (Obrázek 2). Ve vodných roztocích je imino forma v rovnováze s hemiaminal formou PBD, v protických rozpouštědlech (alkoholy) přechází tyto látky v methoxy formu a jsou zároveň v rovnováze s hemiaminal formou PBD (Gerratana, 2012; Hurley, 1977; Kumar & Lown, 2003).

V minulosti byla v některých případech dána různým formám téže látky odlišná jména. Například methoxy derivát porothramycinu byl pojmenován jako porothramycin B, zatímco hemiaminal forma jako porothramycin A (Tsunakawa *et al*, 1988), což v některých případech komplikuje názvosloví PBD. Proto bylo navrženo pokládat imino formu (molekula PBD s nesubstituovaným C11) za základní látku a neudělovat samostatná jména ostatním formám PBD (Gerratana, 2012), neboť právě v této formě jsou PBD pravděpodobně biologicky aktivní.



Obrázek 2. Přechody mezi imino-hemiaminal-methoxy formami PBD (Převzato Kumar & Lown, 2003) .

Dalším možným substituentem v pozici C11 je oxo-skupina (RK1441B, oxotomaymycin, oxo derivát limazepinů). Přeměna PBD na formu s C11 oxo-skupinou (Obrázek 3) má za následek ztrátu biologické aktivity (Gerratana, 2012). V případě producenta tomaymycinu je tato látka uvnitř buňky enzymaticky přeměňována konstitutivní „tomaymycin dehydrogenasou“ na neaktivní oxotomaymycin (Hurley *et al*, 1976). Je tedy velice pravděpodobné, že se jedná o jeden z mechanismů rezistence (Hurley, 1977).

Posledním známým substituentem C11 je indolová skupina tilivallinu (Mohr & Budzikiewicz, 1982). Na tomto místě stojí za zmínku překvapivá úloha této látky, tilivallin je totiž prvním případem PBD v roli bakteriálního toxinu (Schneditz *et al*, 2014).

Anthranilátový kruh přirozeně se vyskytujících PBD může být substituován různými funkčními skupinami, hydroxylem, methoxy nebo methylovou skupinou, stejně tak může být glykosylována (Obrázek 4). Jen v ojedinělých případech PBD je kompletně bez substituentů (Fotso, 2010).

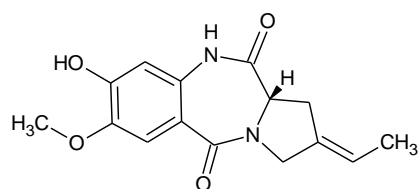
Hydroxylová skupina na anthranilátovém kruhu v pozici C9 je zodpovědná za kardiotoxicitu PBD (Hurley & Thurston, 1984). Nebylo ale prokázáno, že by byla nezbytná pro biologickou aktivitu (Chen *et al*, 2004), proto jsou pro testování látek potenciálně využitelných v klinické praxi upřednostňovány PBD s nesubstituovaným C9 (Gerratana, 2012).

Byl také popsán vliv některých substituentů anthranilátového kruhu (hydroxyl na C8 nebo methoxy skupina na C7) na posun rovnováhy ve prospěch biologicky aktivní imino formy PBD (Thurston *et al*, 1999).

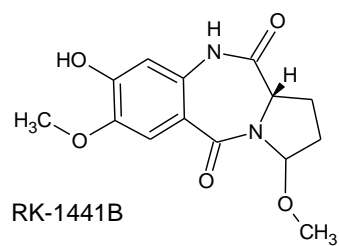
Lepší biologické aktivitě a DNA vazebné afinitě výrazně přispívá O-glykosylace na C7 (Thurston *et al*, 1999). Glykosylovaný C7 je přítomen u sibiromycinu (Parker & Babine, 1982) a sibanomicinu (Itoh *et al*, 1988). Sibiromycin bývá označován jako přirozeně produkovaná látka skupiny PBD s nejvýraznější DNA vazebnou afinitou a biologickou aktivitou (Jackson *et al*, 2014).

Vliv různých funkčních skupin na účinnost PBD byl testován chemickou syntézou desítek nových látek s různou mírou modifikace anthranilátového kruhu. Modifikace anthranilátového kruhu do určité míry ovlivňují DNA vazebnou afinitu a tím tedy biologickou aktivitu PBD, ale zdá se, že nejsou nezbytné pro vazbu k DNA (Thurston *et al*, 1999).

Daleko důležitější je pravděpodobně přítomnost a rozmístění dvojných vazeb v molekule, konkrétně na hydropyrrolovém kruhu. Všechny vazby hydropyrrolového kruhu mohou být nasycené, nenasycené v pozici C2-C3 (C2-endo) nebo může být dvojná vazba mimo kruh na uhlíkatém postranním řetězci navázaném na C2 (C2-exo) jako například u anthramycinu a tomaymycinu (Obrázek 4) (Fotso, 2010; Kumar & Lown, 2003). Právě rozmístění dvojných vazeb má vliv na sílu protinádorového účinku. Všechny PBD s výraznou protinádorovou aktivitou (anthramycin, sibiromycin a tomaymycin) mají C2-endo nebo C2-exo dvojnou vazbu (Gregson *et al*, 2000a; Gregson *et al*, 2000b). Tyto C2-endo a C2-exo dvojné vazby pravděpodobně zlepšují účinnost vazby do malého žlábků zploštěním hydropyrrolového kruhu (Thurston *et al*, 1999). Látky s nejlepšími biologickými vlastnostmi mají ještě další dvojnou vazbu na C2 postranním řetězci (například propenyl u sibiromycinu). Struktura C2 postranního řetězce se liší napříč skupinou PBD a má také vliv na biologickou aktivitu (Gerratana, 2012). V naprosté většině případů je tvořen různě dlouhým a odlišně substituovaným alkylem (Fotso, 2010), existují ale i PBD, kde je na C2 navázán pouze hydroxyl. Takovým příkladem je chicamycin (Konishi *et al*, 1984) a abbeymycin (Hochlowski *et al*, 1987). Další možností je úplná absence substituentů na C2, například u DC-81 (Hu *et al*, 2003) a tilivallinu (Mohr & Budzikiewicz, 1982).

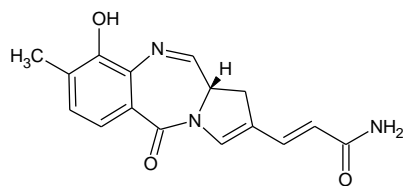


Oxotomaymycin

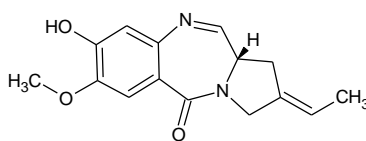


RK-1441B

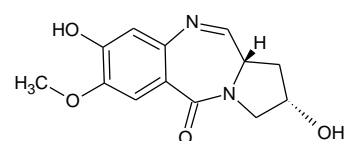
Obrázek 3. PBD postrádající biologickou aktivitu (oxo deriváty PBD).



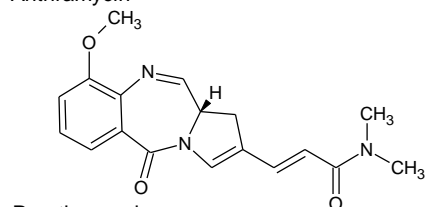
Anthramycin



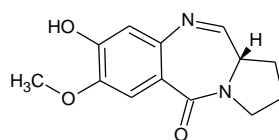
Tomaymycin



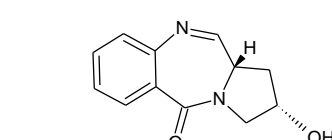
Chicamycin



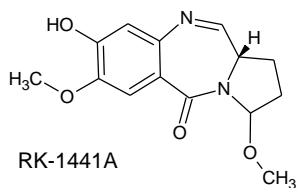
Porothramycin



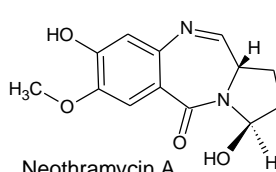
DC-81



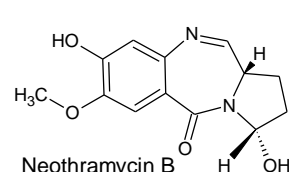
Abbeymycin



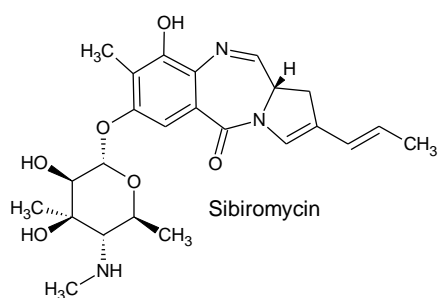
RK-1441A



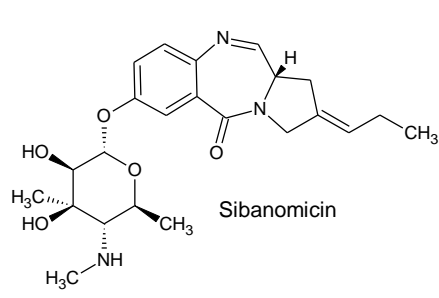
Neothramycin A



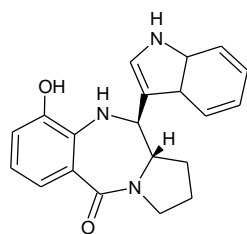
Neothramycin B



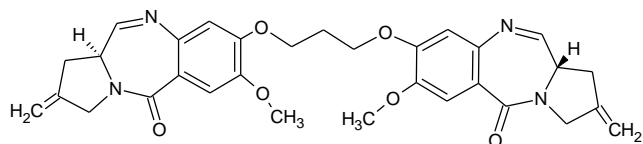
Sibiromycin



Sibanomicin



Tilivallin



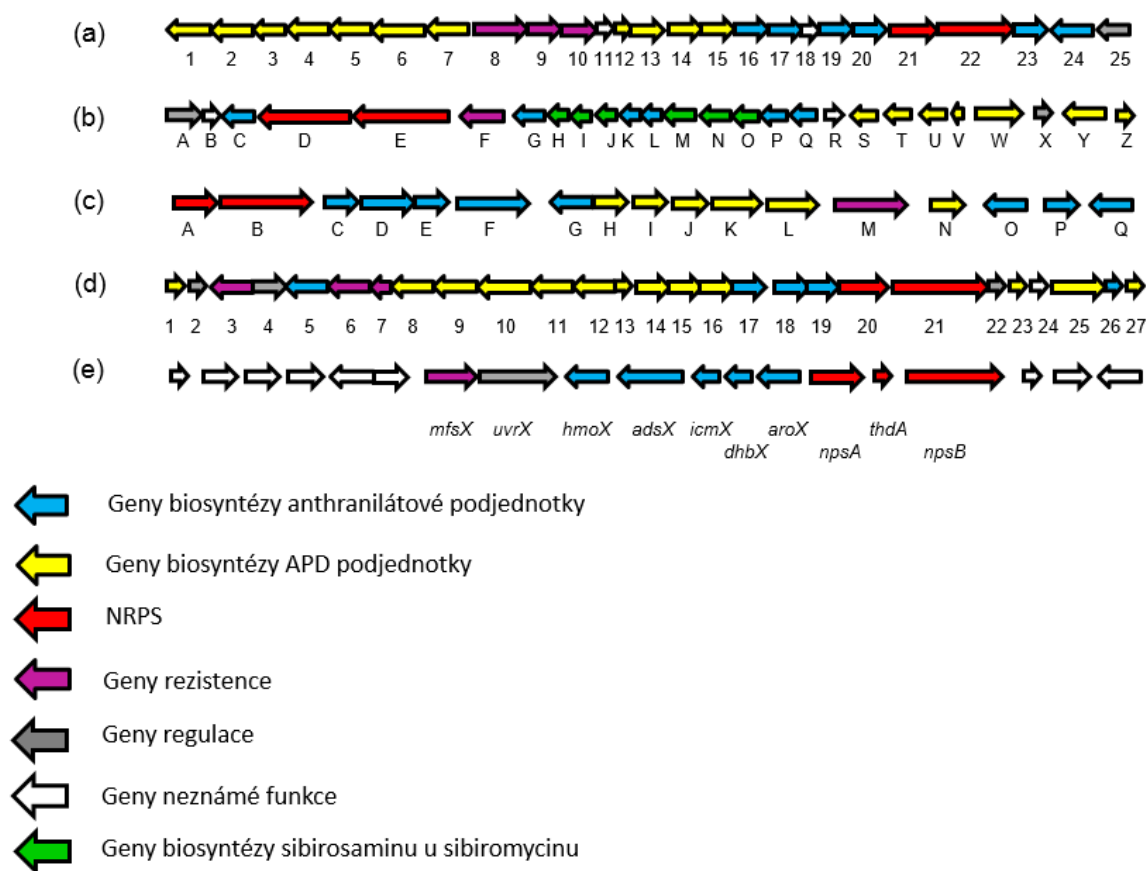
SJG-136

Obrázek 4. Struktury vybraných PBD.

2.3 Biosyntéza PBD

Geny pro biosyntézu sekundárních metabolitů jsou obvykle soustředěny do genových shluků (skupiny úzce funkčně propojených genů) bakteriálního chromozomu. Kromě genů zajišťujících biosyntézu se zde mohou vyskytovat regulační geny biosyntetické dráhy nebo geny rezistence k danému metabolitu.

Do dnešního dne byly popsány genové shluky pro biosyntézu anthramycinu (Hu *et al.*, 2007), sibiromycinu (Li *et al.*, 2009b), tomaymycinu (Li *et al.*, 2009a), porothramycinu (Najmanova *et al.*, 2014) a tilivallinu (Schneditz *et al.*, 2014) (Obrázek 5, Tabulka 1).



Obrázek 5. Schéma genových shluků pro biosyntézu (a) anthramycinu (Hu *et al.*, 2007), (b) sibiromycinu (Li *et al.*, 2009b) (c) tomaymycinu (Li *et al.*, 2009a), (d) porothramycinu (Najmanova *et al.*, 2014) a (e) tilivallinu (Schneditz *et al.*, 2014). Barevně je naznačeno navrhované zapojení genů v biosyntetických drahách. Pro zjednodušení nejsou jednotlivé geny označovány celými názvy (s výjimkou tilivallinového biosyntetického shluku), ale pouze číselným či písmenným označením. Proteiny kódované PBD biosyntetickými shluky jsou dále porovnány v tabulce 1 na následující straně.

Porovnání proteinů kódovaných PBD biosyntetickými shluky					
Pravděpodobná funkce kódovaného proteinu	Anthramycin	Sibiromycin	Tomaymycin	Porothramycin	Tilivallin
amidotransferasa	ORF1			POR8	
aldehyd dehydrogenasa	ORF2				
alkohol dehydrogenasa	ORF3				
cytochrom P450 hydroxylasa	ORF4			POR9	
methyltransferasa	ORF5	SibZ		POR10	
γ-glutamyltransferasa	ORF6	SibY	TomL	POR11	
FAD oxidoreduktasa	ORF7	SibW		POR12	
UvrA "drug resistance" pumpa	ORF8	SibF	TomM		
hydroxylasa/glyoxylasa	ORF9			POR7	
transporter	ORF10			POR6	
neznámá funkce	ORF11				
L-DOPA-2,3 dioxygenasa	ORF12	SibV	TomH	POR13	
tyrosin hydroxylasa	ORF13	SibU	TomI	POR14	
F-420 dependentní reduktasa	ORF14	SibT	TomJ	POR15	
isomerasa	ORF15	SibS	TomK	POR16	
kynureninasa	ORF16	SibQ		POR17	
tryptophan 2,3-dioxygenasa	ORF17	SibP			
neznámá funkce	ORF18				
aromatická C-methyltransferasa	ORF19	SibL		POR18	
aryl formamidasa / esterasa	ORF20	SibK		POR19	
NRPS	ORF21	SibE	TomA	POR20	ThdA, NpsA
NRPS	ORF22	SibD	TomB	POR21	NpsB
kynurenin 3-monooxygenasa	ORF23	SibC		POR21	
FAD-oxidoreduktasa	ORF24		TomQ	POR5	
"represor response" regulátor	ORF25			POR2	
NADPH dependentní FMN reduktasa				POR1	
FMNH2 dependentní monooxygenasa				POR23	
aminomethyltransferasa				POR25	
draslíkový transporter / flavinová monooxygenasa				POR27	
ABC transporter (rodiny UvrA)				POR3	
transkripční regulátor DeoR rodiny				POR4	
protein rodiny NmrA (regulátor / NAD-dependentní epimerasa / dehydratasa)				POR22	
glutamin synthetasa				POR24	
O-methyltransferasa				POR26	
salicyl-CoA hydroxylasa/NADH dependentní flavinová oxidoreduktasa		SibG	TomO		
4-oxalocrotonat tautomerasa			Tom N		
regulátor		SibA			
neznámá funkce		SibB			
glycosyltransferasa		SibH			
dTDP-glukoso synthasa		SibI			
dTDP-4-keto-6-deoxyglucososa 3,5-epimerasa		SibJ			
C-methyltransferasa		SibM			
dTDP-4-keto-6-deoxyglucosa transaminasa		SibN			
N-methyltransferasa		SibO			
neznámá funkce		SibR			
transkripční regulátor		SibX			
DAHPh synthasa			TomC		AroX
phenazin biosyntetický protein PhzE			TomD		
phenol-2-monooxygenasa (reduktasová složka)			TomE		
phenol-2-monooxygenasa (oxygenasová složka)			TomF		
methyltransferasa			TomG		
anthranilát synthasa			TomP		
2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoat dehydrogenasa					DhbX
isochorismatasa					IcmX
2-Amino-2-deoxy-isochorismat synthasa					AdsX
4-hydroxyphenylacetát 3- monooxygenasa					HmoX
excinukleasa ABC podjednotka A					UvrX
permeasa ("major facilitator superfamily protein")					MfsX

biosyntéza APD podjednotky	biosyntéza anthranilátové podjednotky	NRPS	biosyntéza cukerné podjednotky u sibiromycinu	rezistence / regulace
----------------------------	---------------------------------------	------	---	-----------------------

Tabulka 1. Porovnání biosyntetických shluků PBD. Tabula uvádí porovnání proteinů kódovaných jednotlivými biosyntetickými shluky. Barvy rozlišují navrhované zapojení enzymů v dráze biosyntézy dané látky.

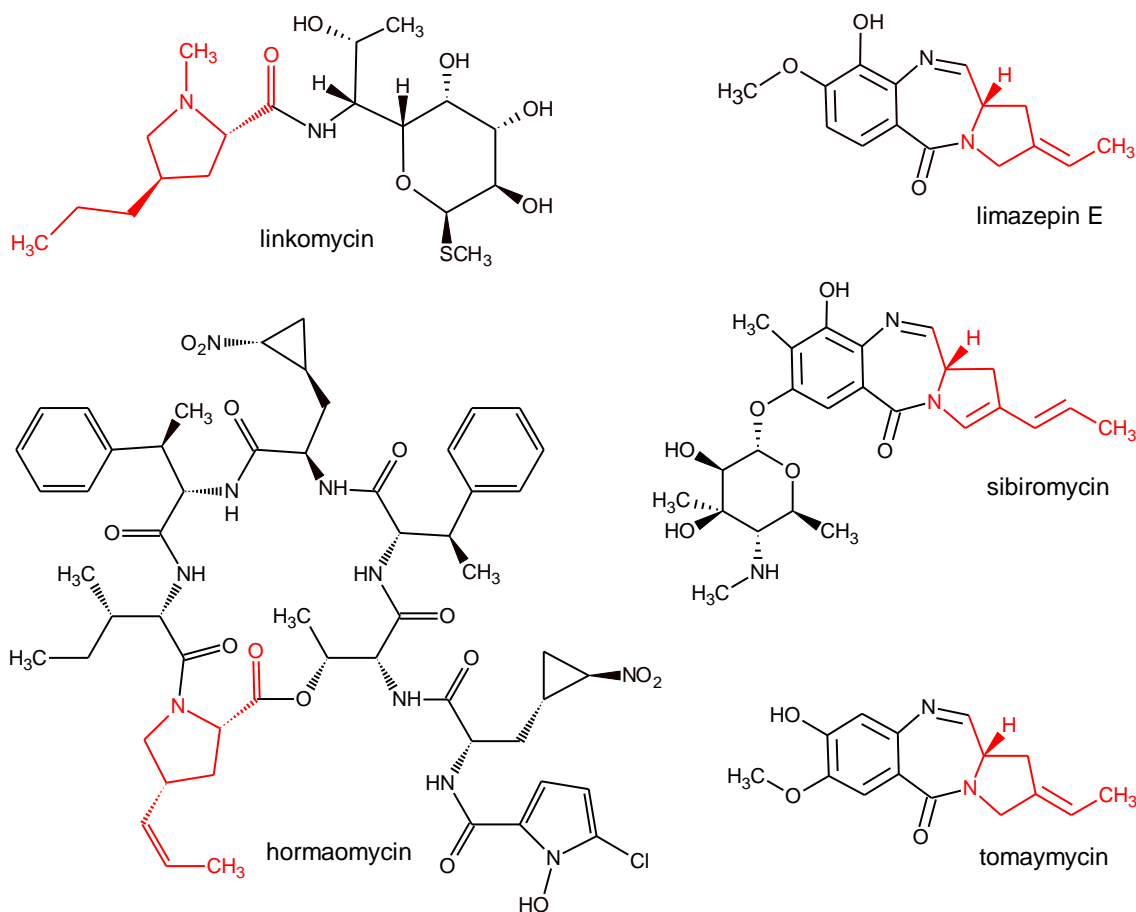
V biosyntéze PBD zastávají klíčovou roli NRPS jejichž moduly rozpoznávají a kondenzují dva aminokyselinové prekurzory, anthranilátovou podjednotku a prolin či prolinový derivát, v naprosté většině případů APD (4-alkyL-L-prolin derivative) za vzniku tricyklické molekuly PBD (dále v kapitole 2.3.3 NRPS). Tyto prekurzory jsou syntetizovány ve dvou oddělených na sobě nezávislých biosyntetických drahách (Hu *et al*, 2007).

2.3.1 Biosyntéza APD podjednotky

Většina PBD sdílí část své biosyntetické dráhy s biosyntézou klinicky využívaného antibiotika linkomycinu (ze skupiny antibiotik linkosamidů) (Hu *et al*, 2007) a bakteriálního hormonu hormaomycinu (Hofer *et al*, 2011). Tyto látky do své struktury inkorporují různě modifikovanou APD podjednotku (Obrázek 6).

Ve skupině PBD i linkosamidových antibiotik však existují výjimky, kde ve struktuře nenacházíme APD, ale L-prolin. Ze skupiny PBD je to například DC-81 (Hu *et al*, 2003) a tilivallin (Mohr & Budzikiewicz, 1982; Schneditz *et al*, 2014), z linkosamidových antibiotik potom celesticetin (Hoeksema, 1968). Dále existují PBD, které mají ve své struktuře místo L-prolinu hydroxyprolin (v předchozí kapitole zmiňovaný chicamycin A a B a abbeymycin). V obou případech je s největší pravděpodobností využíván běžně v buňce dostupný proteinogenní L-prolin. Toto tvrzení je podpořeno absencí genů pro biosyntézu APD podjednotky v genovém shluku pro biosyntézu celesticetinu (Janata *et al*, 2015; Koberska, 2010) a tilivallinu (Schneditz *et al*, 2014).

Biosyntetická dráha APD nevyužívá proteinogenní L-prolin, ale vychází z L-tyrosinu (Hurley, 1980).



Obrázek 6. Látky obsahující ve své struktuře APD podjednotku (linkomycin, hormaomycin a příklady ze skupiny PBD). Struktury odpovídající APD jsou zvýrazněny červenou barvou.

Genové shluky biosyntézy některých PBD, linkomycinu a hormaomycinu obsahují soubor genů pro biosyntézu APD (Hofer *et al*, 2011; Hu *et al*, 2007; Koberska *et al*, 2008; Li *et al*, 2009a; Li *et al*, 2009b; Najmanova *et al*, 2014).

Schéma biosyntézy APD podjednotky bylo nejlépe a nejpodrobněji popsáno pro linkomycin, proto budou i v následujícím textu uváděny reakce a enzymy biosyntézy APD podjednotky antibiotika linkomycinu. Odpovídající geny biosyntézy APD podjednotek PBD, linkomycinu a hormaomycinu jsou navzájem vysoce homologní, proto bude pravděpodobně biosyntéza APD prekurzorů všech výše zmíněných látek probíhat velice podobně.

Celkem bylo identifikováno 6 základních genů kódujících klíčové proteiny biosyntézy APD podjednotky (Tabulka 2). Doposud sekvenované biosyntetické shluky PBD obsahují většinou kompletní sadu genů (Hu *et al*, 2007; Li *et al*, 2009b; Najmanova *et al*, 2014), jejichž homology jsou také součástí genového

shluku pro biosyntézu linkomycinu (Koberska *et al*, 2008). V tomaymycinovém biosyntetickém shluku jeden gen chybí, konkrétně homolog linkomycinového genu *lmbW* (Li *et al*, 2009a). Proteinu LmbW byla již dříve navržena methyltransferasová funkce (Peschke *et al*, 1995). Bylo prokázáno, že sedm z devíti uhlíků pocházejících z L-tyrosinu zůstává ve struktuře APD podjednotky, dva jsou odstraněny a jeden, pocházející z S-adenosylmethioninu, je následně připojen prostřednictvím právě této methyltransferasy LmbW (Brahme *et al*, 1984). Chybějící gen pro methyltransferasu odpovídá výsledné struktuře postranního řetězce APD podjednotky tomaymycinu, který je tvořen pouze dvouuhlíkatým alkylem namísto tříuhlíkatého (Obrázek 6). S podobnou situací se setkáváme v hormaomyciovém biosyntetickém shluku, kde také jeden gen chybí, tentokrát ale homolog genu *lmbX* (Hofer *et al*, 2011). Proteinu LmbX byla přiřazena isomerasová funkce. Bez aktivity LmbX nedochází k následné redukci dvojné vazby APD postranního řetězce (aktivitou LmbY), tato dvojná vazba tedy zůstává ve struktuře APD podjednotky hormaomycinu zachována (Obrázek 6).

Proteiny biosyntézy APD podjednotky						
Funkce proteinu	Anthramycin	Sibiromycin	Tomaymycin	Porothramycin	Linkomycin	Hormaomycin
methyltransferasa	ORF5	SibZ		POR10	LmbW	HrmC
γ -glutamyltransferasa	ORF6	SibY	TomL	POR11	LmbA	HrmG
L-DOPA-2,3 dioxigenasa	ORF12	SibV	TomH	POR13	LmbB1	HrmF
tyrosin hydroxylasa	ORF13	SibU	TomI	POR14	LmbB2	HrmE
F-420 dependentní reduktasa	ORF14	SibT	TomJ	POR15	LmbY	HrmD
pravděpodobně isomerasa	ORF15	SibS	TomK	POR16	LmbX	

Tabulka 2. Porovnání zastoupení proteinů zapojených v biosyntéze APD podjednotky kódovaných biosyntetickými shluky PBD, linkomycinu a hormaomycinu.

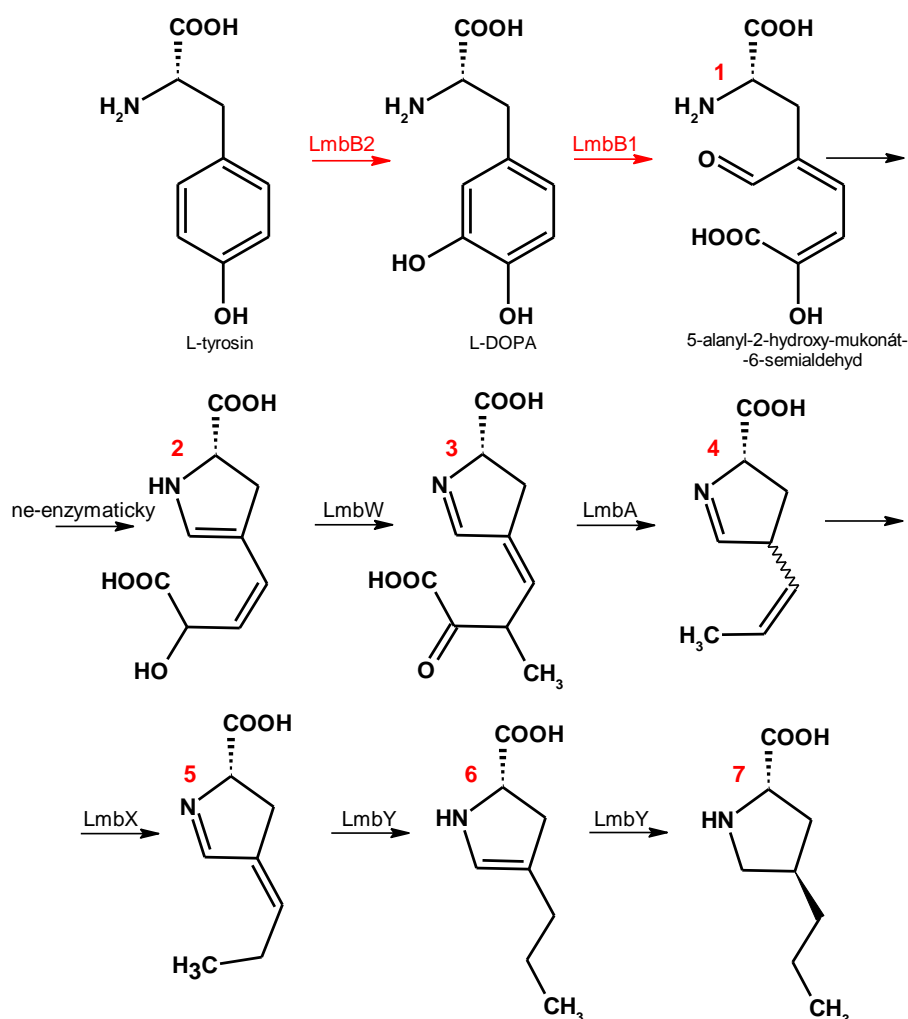
Některé biosyntetické shluky PBD obsahují geny, jejichž produkty byly také funkčně přiřazeny k biosyntéze APD a jsou pravděpodobně zodpovědné za další modifikace APD podjednotky (Tabulka 1).

První zmínka o biosyntéze APD podjednotky u linkomycinu je z roku 1971 (Witz *et al*, 1971). Obecné schéma biosyntézy společné pro PBD a linkomycin bylo představeno přibližně o deset let později (Brahme *et al*, 1984; Hurley, 1980), ale s ohledem na nově publikované informace muselo být radikálně revidováno (Jirásková *et al.*, 2015 v řízení).

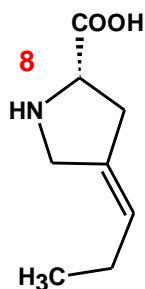
První dva kroky dráhy přeměňující L-tyrosin na látku **2** (Obrázek 7) byly již funkčně prokázány jak v případě biosyntézy linkomycinu (Colabroy *et al*, 2008; Novotna *et al*, 2004; Novotna *et al*, 2013), tak i u PBD (Connor *et al*, 2011; Saha *et al*, 2015). Nejprve je aromatické jádro tyrosinu hydroxylováno tyrosin hydroxylasou na 3,4-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA). Reakce je katalyzována proteinem LmbB2 u linkomycinu (Novotna *et al*, 2013) a jeho homology u PBD ORF13/TomI/SibU/POR14. Následuje 2,3-extradiolové štěpení, při kterém se rozštěpí aromatické jádro a vzniká 5-alanyl-2-hydroxymukonát-6-semialdehyd (látko **1**). Tato reakce je katalyzována enzymem L-DOPA-2,3-dioxygenasou LmbB1 u linkomycinu (Colabroy *et al*, 2008; Novotna *et al*, 2004) a jeho homology u PBD ORF12/TomH/SibV/POR13. Následně dochází k intramolekulární cyklizaci do formy pětičetného heterocyklu s jedním atomem dusíku za vzniku látky **2**.

Následující kroky biosyntézy APD podjednotky byly navrženy nově (Jirásková *et al.*, 2015 v řízení) Dráha biosyntézy APD pokračuje methylací látky **2**, tuto reakci katalyzují methyltransferasy LmbW/ORF5/SibZ/POR10. V biosyntéze látek s dvouuhlíkatým postranním řetězcem APD podjednotky je pravděpodobně tato methylace vynechána a produkt enzymu LmbB1 je přímo substrátem LmbA a jeho homology. V biosyntéze tomaymycinu tedy TomL štěpí látku **2**. Další reakce katalyzované enzymy biosyntézy tomaymycinu probíhají analogicky dále popsaným reakcím. V biosyntéze látek s tříuhlíkatým postranním řetězcem APD enzymy LmbA/ORF6/SibY/POR11 štěpí látku **3**. Následně isomerasa LmbX/ORF15/TomK/SibS/POR16 katalyzuje přesun dvojné vazby z pozice C- α , C- β látky **4** do pozice C-4, C- α za vzniku prekurzoru **5**. Protein LmbY v biosyntéze linkomycinu postupně redukuje dvě dvojné vazby látky **5**, přes prekurzor **6**, za vzniku finálního produktu (látko **7**) biosyntetické dráhy. V případě biosyntézy PBD předpokládáme odlišný mechanismus redukce katalyzovaný homology LmbY, tedy ORF14/TomJ/SibT/POR15. Pravděpodobně se redukuje pouze dvojná vazba v pětičetném kruhu a dvojná vazba, která je u látky **5** vně

kruhu zůstává zachována a vzniká látka **8** (Obrázek 8). Reakce probíhá analogicky taktéž u PBD s 2C postranním řetězcem. Předpokládáme, že do kondenzační reakce u PBD vstupuje APD podjednotka odpovídající látce **8** (nepublikovaná data).



Obrázek 7. Schéma biosyntézy APD. Červeně jsou označeny enzymy, jejichž funkce již byla experimentálně prokázána. Převzato a upraveno (Jirásková *et al.*, 2015 v řízení).



Obrázek 8. Předpokládaný produkt reakce katalyzované homology proteinu LmbY u PBD (u PBD ORF14/TomJ/SibT/POR15). Dochází k redukci pouze jediné dvojně vazby, která je přítomna v pětičlenném kruhu. Reakce probíhá analogicky taktéž u PBD s 2C postranním řetězcem.

2.3.2 Biosyntéza anthranilátové podjednotky

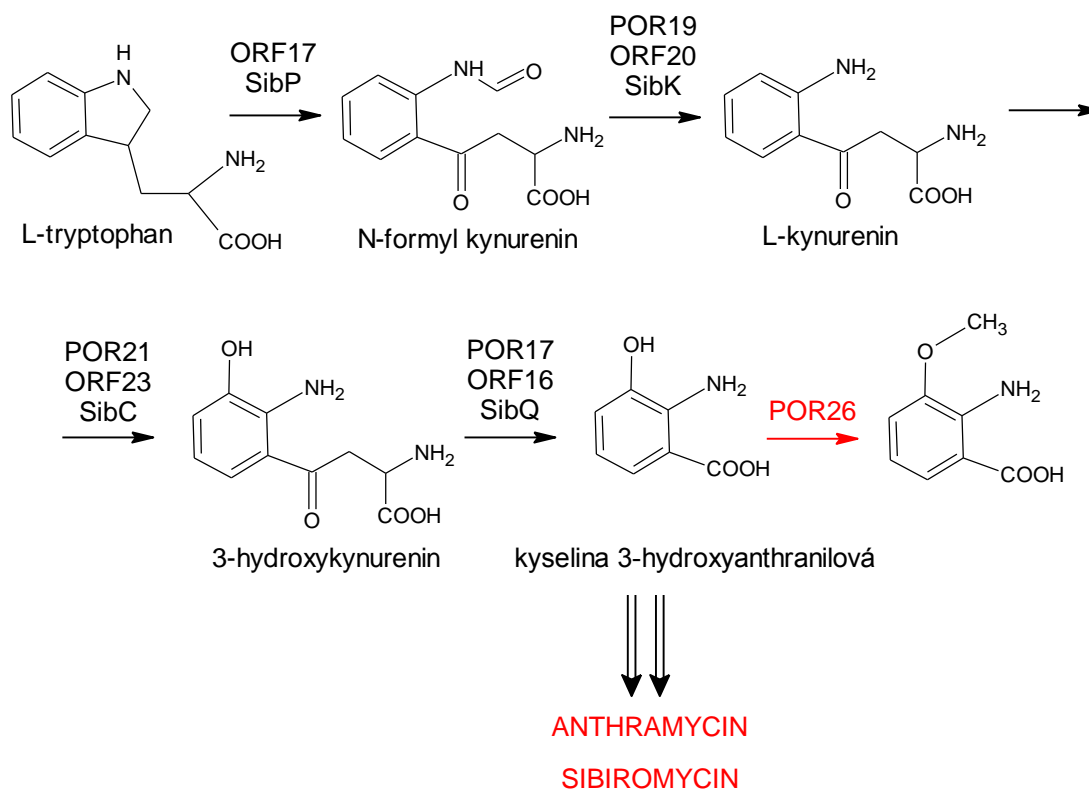
Na základě studia doposud sekvenovaných biosyntetických shluků PBD byly navrženy dvě základní dráhy biosyntézy anthranilátové podjednotky, kynureninová dráha typická pro PBD s hydroxylovaným C9 a dále dráha chorismátová pro PBD v této pozici nehydroxylované (Li *et al.*, 2009a; Li *et al.*, 2009b). Obě dráhy jsou běžně využívány v primárním metabolismu. Je tedy velice pravděpodobné, že evoluce biosyntetických shluků probíhala začleňováním extra kopií primárně metabolických genů do PBD shluků.

2.3.2.1 Kynureninová dráha

Kynureninová dráha je založena na postupné přeměně L-tryptofanu na kyselinu 3-hydroxyanthranilovou. Tato dráha (Obrázek 9) je v primárním metabolismu využívána k biosyntéze nikotinamidadenindinukleotidů (NAD⁺) právě degradací aminokyseliny L-tryptofanu přes kyselinu 3-hydroxyanthranilovou (Kurnasov *et al.*, 2003). Kyselina 3-hydroxyanthranilová je základem pro biosyntézu anthranilátové podjednotky PBD hydroxylovaných na uhlíku v pozici C9.

Přeměny L-tryptofanu na kyselinu 3-hydroxyanthranilovou se účastní čtyři enzymy. V genových shlucích pro biosyntézu anthramycinu a sibiromycinu jsou geny pro kompletní sadu všech enzymů (Hu *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009b). V genovém shluku pro biosyntézu porothramycinu nebyl identifikován gen kódující tryptofan 2,3-dioxygenasu (TDO). Tento enzym katalyzuje první krok dráhy (Najmanova *et al.*, 2014). Předpokládá se, že tuto funkci vykonává TDO z primárního metabolismu, jako je tomu například v biosyntéze antibiotika daptomycinu (Baltz *et al.*, 2010).

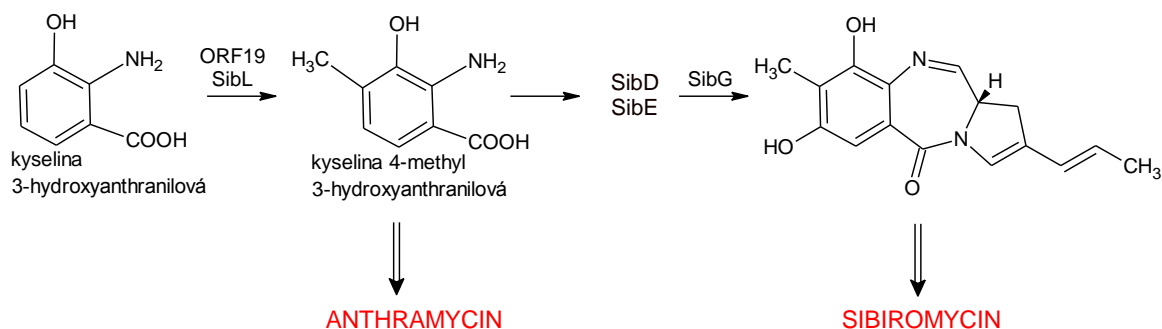
Kyselina 3-hydroxyanthranilová je v biosyntéze porothramycinu pravděpodobně methylována methyltransferasou POR26 (Obrázek 9) a v této formě je rozpoznávána příslušnou NRPS (Najmanova *et al.*, 2014).



Obrázek 9. Biosyntéza kyseliny 3-hydroxyanthranilové, kynureninová dráha.

ORF: biosyntéza anthramycinu, Sib: biosyntéza sibiromycinu, POR: biosyntéza porothramycinu
 Kyselina 3-hydroxyanthranilová je společným prekurzorem biosyntézy anthranilátové podjednotky anthramycinu a sibiromycinu a porothramycinu. Reakce katalyzovaná POR26 je unikátní pro biosyntézu porothramycinu. (Převzato a upraveno Najmanova *et al.*, 2014).

Biosyntetická dráha anthramycinu a sibiromycinu pokračuje také methylací 3- hydroxyanthranilové kyseliny, ale v odlišné pozici. Reakci katalyzuje C-methyltransferasa ORF19/SibL (Hu *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009b). Vzniká kyselina 4-methyl-3-hydroxyanthranilová, která je při biosyntéze anthramycinu v této podobě pravděpodobně rozpoznávána A-doménou NRPS ORF21 (Phelan *et al.*, 2009). Také v biosyntéze sibiromycinu NRPS SibE rozpoznává kyselinu 4-methyl-3-hydroxyanthranilovou, která je ale ještě před kondenzací hydroxylována aktivitou enzymu SibG (v momentě navázání kyseliny 4-methyl-3-hydroxyanthranilové na thiolační doménu NRPS SibE), po kondenzační reakci bude tento hydroxyl na uhlíku v pozici C7 (Giessen *et al.*, 2011).



Obrázek 10. Pokračování biosyntézy anthranilátové podjednotky u anthramycinu a sibiromycinu (Převzato a upraveno Li *et al*, 2009b). V biosyntéze anthramycinu a sibiromycinu příslušná NRPS rozpoznává kyselinu 4-methyl-3hydroxyanthranilovou, v případě biosyntézy sibiromycinu je ještě před samotnou kondenzací tato látka hydroxylována aktivitou proteinu SibG.

Některé modifikace anthranilátové podjednotky probíhají až po kondenzaci na tricyklické molekule PBD, jako například glykosylace sibiromycinu. Na hydroxyly v pozici C7 dochází k vazbě aminocukru sibirosaminu glykosyltransferasou SibH (Li *et al*, 2009b)

2.3.2.2 Chorismátová dráha

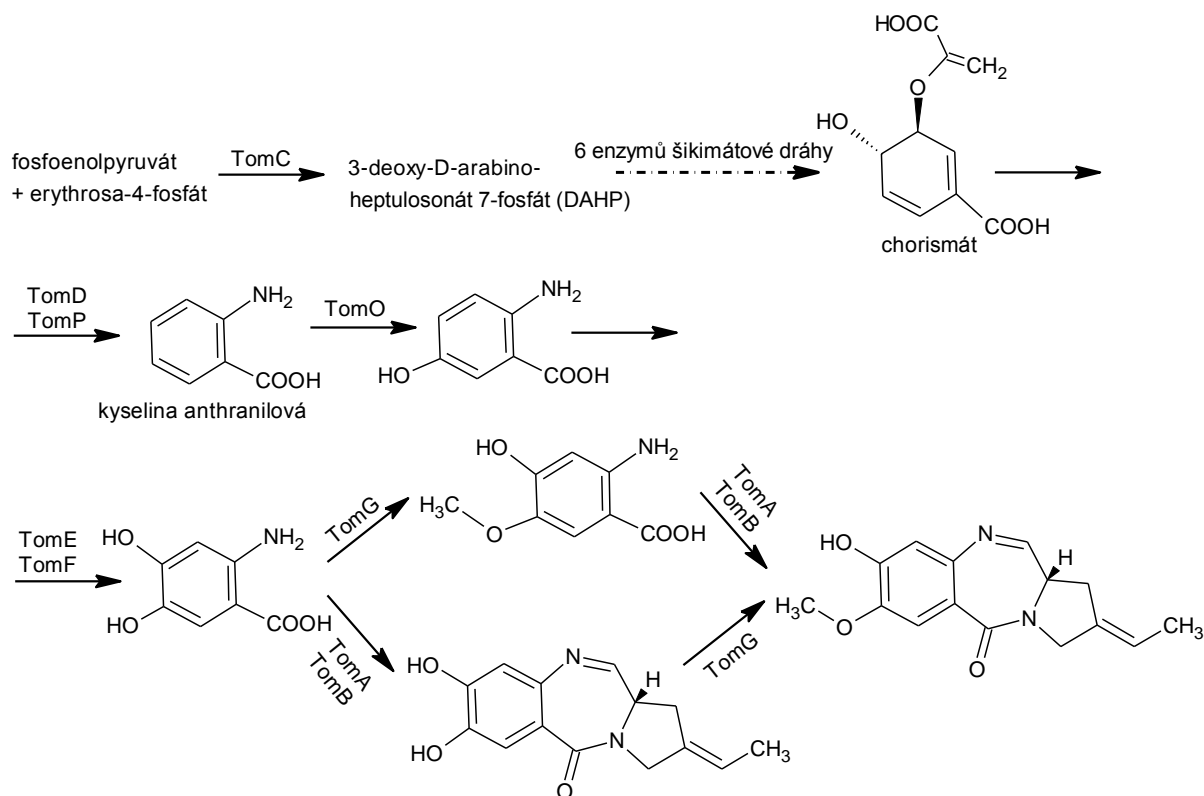
V případě tomaymycinu byla pro biosyntézu anthranilátové podjednotky prokázána jiná dráha. Předpokládá se, že chorismátová dráha bude společná pro všechny PBD s nehydroxylovaným C9 (Li *et al*, 2009a).

Produktem chorismátové dráhy je kyselina anthranilová. Anthranilátová podjednotka je v tomto případě odvozena od chorismátu (Obrázek 11), produktu šikimátové dráhy (Li *et al*, 2009a). Šikimátovou dráhu tvoří kaskáda sedmi reakcí a vznikající chorismát je běžně v primárním metabolismu prekurzorem biosyntézy aromatických aminokyselin phenylalaninu, tyrosinu a tryptofanu (Bentley, 1990).

První krok šikimátové dráhy v biosyntéze tomaymycinu katalyzuje TomC, 3-deoxyarabino-heptulosonát 7-fosfát (DAHP) synthasa. Další enzymy šikimátové dráhy v biosyntetickém genovém shluku kódovány nejsou, proto je velice pravděpodobné zapojení proteinů z primárního metabolismu. Chorismát je dále anthranilát synthasou (TomD, TomP) přeměněn na již zmíněnou anthranilovou kyselinu (Li *et al*, 2009a).

Využívání enzymů primárního metabolismu není v biosyntéze sekundárních metabolitů ojedinělé. S obdobnou situací se setkáváme také v biosyntéze látky phenazinu u *Pseudomonas fluorescens*, kde je rovněž zapojena šikimátová dráha. V biosyntetickém shluku jsou geny pouze pro DAHP synthasu a anthranilát synthasu, zbývající kroky jsou katalyzovány enzymy šikimátové dráhy z primárního metabolismu (McDonald *et al*, 2001).

Anthranilová kyselina je následně hydroxylována pomocí TomO, následuje druhá hydroxylace katalyzovaná TomE a TomF. Další reakci katalyzuje TomG, což je methyltransferasa. Není jisté, jestli tento enzym methyluje hydroxylovou skupinu před nebo až po kondenzaci molekuly PBD, proto i následující obrázek (Obrázek 11) uvádí obě možné varianty.



Obrázek 11. Chorismátová dráha, biosyntéza anthranilátové podjednotky tomaymycinu.
(převzato a upraveno Li *et al.*, 2009a).

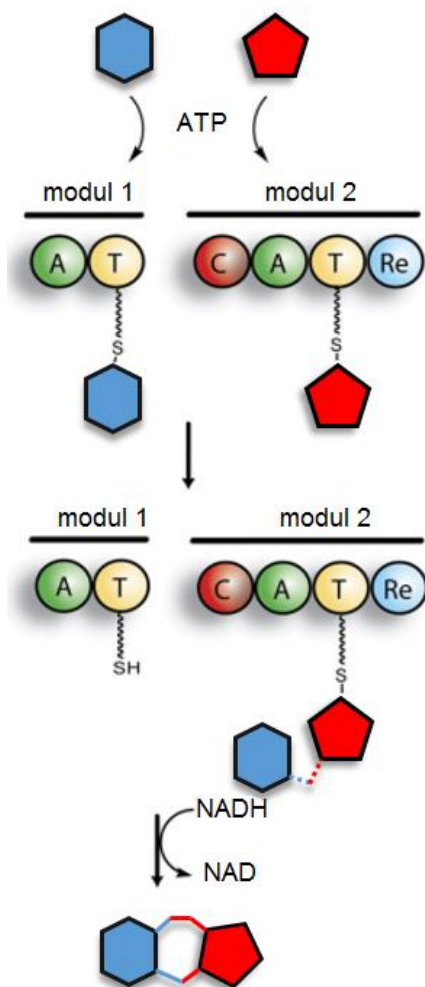
2.3.3 Kondenzační reakce, NRPS

NRPS jsou multimodulární enzymy podílející se na biosyntéze velkého množství významných sekundárních metabolitů u bakterií a hub. Hrají zásadní roli v biosyntéze některých antibiotik, antivirotik, sideroforů, toxinů, biosurfaktantů, cytostatik, protinádorových a imunosupresivních látek (Finking & Marahiel, 2004; Marahiel *et al*, 1997). Na rozdíl od ribosomální syntézy proteinů, NRPS nevyužívají mRNA jako templát a kromě proteinogenních aminokyselin rozpoznávají celou řadu dalších substrátů (Kleinkauf & von Dohren, 1990).

Každý modul NRPS je zodpovědný za prodloužení vznikajícího oligomeru o jeden monomer postupnou sérií aktivačních a kondenzačních reakcí. Tricyklické molekuly PBD vznikají kondenzací dvou aminokyselinových prekurzorů, proto také v biosyntetických shlucích PBD nacházíme geny pro dvě NRPS (tzv. bimodulární NRPS systémy). Jádrem každého NRPS modulu obsahuje několik domén. U PBD se setkáváme s adenylačními doménami (A-domény), thiolačními (T-domény, často označovány jako PCP, peptidyl carrier protein), kondenzačními (C-domény) a reduktázovými (Re-domény) (Giessen *et al*, 2011; Hu *et al*, 2007).

Velice důležitá je funkce A-domén, které vybírají a aktivují aminokyselinové prekurzory (aktivace adenylací za spotřeby ATP v přítomnosti Mg^{2+} iontů) pro následnou kondenzaci. Substrátová specifita A-domén je určena deseti aminokyselinovými zbytky (tzv. neribosomální kód) v substrát vazebném místě (Conti *et al*, 1997; Stachelhaus *et al*, 1999).

První NRPS zapojená v biosyntéze PBD specificky rozpoznává a aktivuje pomocí své A-domény anthranilátovou podjednotku (Obrázek 12). Takto aktivovaný substrát je následně přenesen na T-doménu, kde je vázán thioesterovou vazbou. A-doména druhé NRPS rozpoznává a aktivuje APD podjednotku, která je poté rovněž kovalentně vázána k T-doméně. Oba prekurzory jsou dále kondenzovány za vzniku peptidové vazby na kondenzační (C) doméně. Uvolnění produktu je standardně katalyzováno thioesterázovou (TE) doménou a probíhá hydrolyticky. Anthramycinová a sibiromycinová NRPS obsahuje neobvyklou terminální NADH-vazebnou reduktázovou (Re) doménu, což nasvědčuje možnému reduktivnímu mechanismu uvolnění dipeptidu (Giessen *et al*, 2011; Hu *et al*, 2007). Je možné předpokládat, že stejný mechanismus uvolňování bude také součástí biosyntézy všech ostatních PBD.



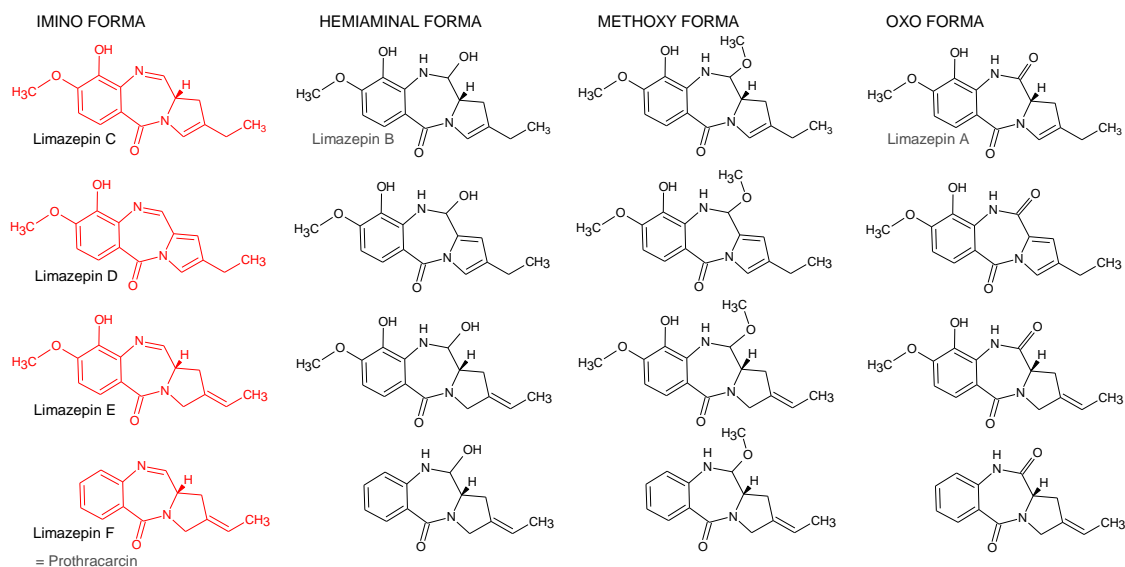
Obrázek 12. Schéma neribosomální syntézy PBD s reduktivním uvolněním vznikající tricyklické molekuly.

Modrým symbolem je naznačena anthranilátová podjednotka, červeným APD podjednotka. Struktury podjednotek jsou zobrazeny pouze symboly, protože doposud není zcela jasné, v jaké podobě vstupují podjednotky všech PBD do kondenzační reakce (Převzato a upraveno Hu *et al.*, 2007).

2.4 Limazepiny

V roce 2009 byl identifikován nový producent PBD, zařazený na základě sekvenční 16S rDNA do taxonomické skupiny rodu *Micrococcus* (*Micrococcus* sp., kmen ICBB 8177), což je první nález producenta PBD u této skupiny mikroorganismů. Dle publikace *Micrococcus* sp. ICBB 8177 produkuje celkem sedm různých PBD pojmenovaných jako limazepiny (limazepin A, B1 a B2, C, D, E a F) a dále již dříve popsány prothracarcin, patřící také do téže skupiny látek (Fotso *et al*, 2009).

Podle Obrázku 13 je zřejmé, že se u některých popsáných limazepinů jedná pouze o různé formy téže látky. Na základě doporučení (Gerratana, 2012) je za základní formu PBD považována biologicky aktivní imino forma, ostatní formy vznikají pravděpodobně důsledkem podmínek izolace a analýzy daných látek (popsáno v kapitole 2.2 Struktura PBD). Struktura prothracarcinu je dokonce zcela totožná s limazepinem F, přesto jsou obě látky uváděny v publikaci zvlášť.



Obrázek 13. Struktury limazepinů A-F. Červeně jsou znázorněny struktury limazepinů reálně produkováných kmenem *Micrococcus* sp. ICBB 8177 (biologicky aktivní imino formy). Druhý sloupec obsahuje hemiaminal formy limazepinů, ve třetím sloupci jsou zobrazeny methoxy a v posledním sloupci oxo deriváty (pravděpodobně produkt rezistenčních mechanismů). Limazepiny B a A jsou tedy jen odlišnými formami limazepinu C.

Ačkoli tedy *Micrococcus* sp. ICBB 8177 produkuje pravděpodobně jen 4 různé limazepiny (červeně označené látky na obrázku 13), z hlediska evoluce PBD se jedná o unikátní modelový mikroorganismus, protože produkuje 4 různé limazepiny (limazepin C, D, E, F), které se podstatně liší svými strukturami. Jediný organismus produkuje PBD s hydroxylovou skupinou na C9 (limazepin C, D a E), ale zároveň také látky v této pozici nehydroxylované (limazepin F). Byly popsány dvě různé dráhy biosyntézy anthranilátové podjednotky (podrobně v kapitole 2.3.2 Biosyntéza anthranilátové podjednotky), kynureninová (Li *et al*, 2009a) a chorismátová (Li *et al*, 2009a). Dle dosavadních poznatků by anthranilátová podjednotka limazepinů C, D a E měla být syntetizována kynureninovou dráhou (specifická dráha pro PBD s hydroxylem na C9) a v biosyntéze anthranilátové podjednotky limazepinů F by měla být zapojena chorismátová dráha (dráha pro PBD nehydroxylované v pozici C9). Zůstává tedy otázkou, jestli budou u producenta limazepinů zapojeny obě dvě dráhy, nebo nějaká nová zcela odlišná dráha.

Produkované limazepiny C, D, E a F se také podstatně liší uspořádáním dvojných vazeb APD podjednotky, celkem můžeme pozorovat tři různé modifikace. Druhým zajímavým aspektem bude zcela jistě objasnění biosyntézy APD, neboť právě saturace APD podjednotky má značný vliv na biologickou aktivitu látek skupiny PBD.

3. CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem diplomové práce bylo identifikovat, sekvenovat a charakterizovat genový shluk pro biosyntézu limazepinů.

Jednotlivé úkoly byly definovány v následujících bodech:

- připravit kosmidovou genomovou knihovnu (z chDNA kmene *Micrococcus* sp. ICBB 8177)
- identifikovat a izolovat a sekvenovat genový shluk pro biosyntézu limazepinů
- analyzovat jednotlivé geny limazepinového biosyntetického shluku
- navrhnout schéma biosyntézy limazepinů,
- osekvenovat genom kmene *Micrococcus* sp. ICBB 8177, zavést v laboratoři bioinformatické metody zpracování sekvence bakteriálního genomu (anotace genů, vyhledání genových shluků sekundárního metabolismu)

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

4.1.1 Bakteriální kmeny a vektory

***Micrococcus* sp. ICBB 8177** Kmen, který produkuje limazepiny byl získán z laboratoře Prof. Taifo Mahmuda, Oregon State University. Izolát je původem z Indonesie (Fotso *et al*, 2009).

***Escherichia coli* JM109** (Promega) Tento kmen byl použit k transformaci kosmidovou DNA pro namnožení kosmidů.

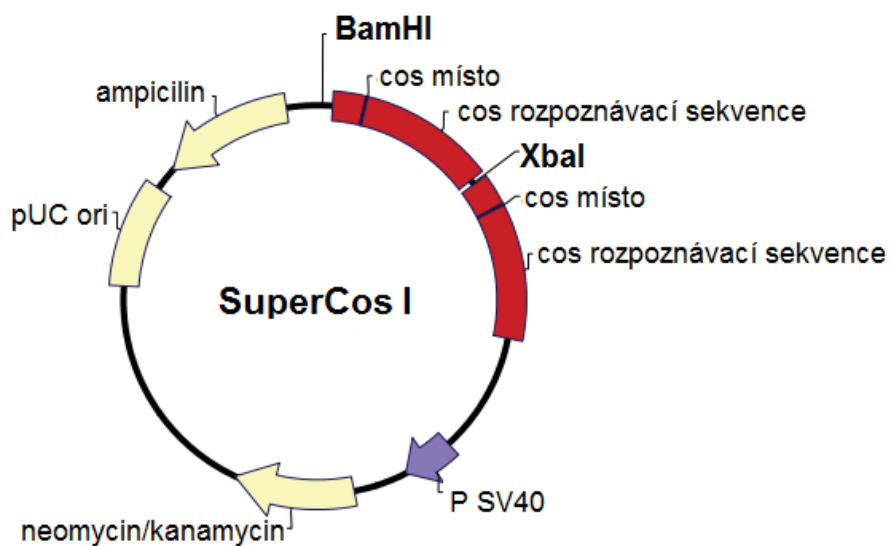
- Genotypové vlastnosti kmene: *endA1*, *recA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *relA1*, *supE44*, $\Delta(lac-proAB)$, [F'*traD36*, *proAB*, *laql^qZ* Δ M15]

***Escherichia coli* VCS 257** (Agilent Technologies, kmen byl součástí kitu **Gigapack III Gold packaging extrakt**) Kmen byl použit při přípravě kosmidové knihovny. Do buněk byly transfekovány linearizované kosmidy (**SuperCos I**) ligované s fragmenty chDNA.

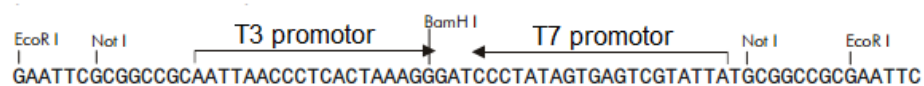
- Genotypové vlastnosti kmene: *supE44*, *supF58*, *hsdS3*(r_B^- m_B^-), *dapD8*, *lacY1*, *glnV44*, $\Delta(gal-uvrB)47$, *tyrT58*, *gyrA29*, *tonA53*, $\Delta(thyA57)$

SuperCos I (Stratagene) je kosmid o velikosti 7,9 kbp (Obrázek 14). Byl použit pro přípravu genomové knihovny. Vektor je vhodný pro vkládání fragmentů DNA o délce 30-42 kbp, nese geny rezistence k ampicilinu a kanamycinu. V těsném sousedství klonovacího místa se nachází bakteriofágové promotory T3 a T7, které umožňují sekvenování okrajových částí inzertu z univerzálních primerů odpovídajících sekvencím promotorů. Vektor SuperCos I rovněž obsahuje dvě λ cos místa, což po přidání fágového extraktu umožňuje pakování ligační směsi.

A



B



Obrázek 14. Schéma vektoru SuperCos I (A) a jeho klonovacího místa (B)

4.1.2 Enzymy a chemikálie

Enzymy	Výrobce
Restrikční enzymy XbaI BamHI	New England Biolabs
LA DNA Mix polymerasa	Top Bio
Taq purple polymerasa	Top-Bio
T4 DNA ligasa	New England BioLabs
Lysozym	Sigma-Aldrich
Proteinasa K	Carl Roth
RNasa A	Sigma-Aldrich
CIP (alkalická fosfatasa z telecí střevní sliznice)	New England BioLabs

Chemikálie	Výrobce
octan sodný	Sigma-Aldrich
agar	Oxoid
agarosa	Invitrogen
ampicilin	Sigma-Aldrich
betain	Sigma-Aldrich
BSA (hovězí sérový albumin)	New England Biolabs
CaCO ₃ (uhličitan vápenatý)	Penta
DMSO (dimethylsulfoxid)	Serva
dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) pro PCR	New England Biolabs
dATP	Sigma-Aldrich
EDTA (ethyldiamintetraoctová kyselina)	Sigma
ethanol	Fagron
EtBr (ethidium bromid)	Sigma-Aldrich
FeSO ₄ ·7H ₂ O (síran železnatý heptahydrát)	Lach-Ner
fenol	PanReac AppliChem
glukosa	Lach-Ner
glycerol	Lachema
NaCl (chlorid sodný)	Lach-Ner
chloroform	Penta
isopropanol	Lachema
K ₂ HPO ₄ (hydrogenfosforečnan draselný)	Lachema
kanamycin	Sigma-Aldrich
kvasničný extrakt	Oxoid
maltosa	Lachema
MgCl ₂ ·6H ₂ O (chlorid hořečnatý hexahydrát)	Sigma-Aldrich
MgCl ₂ (vodný roztok 25 mM) pro PCR	Roche
MgSO ₄ ·7H ₂ O (síran hořečnatý heptahydrát)	Merck
MnSO ₄ ·H ₂ O síran manganatý monohydrát	Merck
NaCl (chlorid sodný)	Lach-Ner
(NH ₄) ₂ SO ₄ (síran amonný)	Sigma-Aldrich
nonidet (P-40 oktylfenoxypolyethoxyethanol)	Amresco
pepton	Imuna
SDS (Sodium dodecyl sulfát)	Sigma-Aldrich
sladový extrakt	Oxoid
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Lach-Ner
trypton	Becton, Dickinson
želatina	Lachema

4.1.3 Kultivační média

LB médium	
trypton	10 g
kvasničný extrakt	5 g
NaCl	10 g
dH ₂ O	do objemu 1000 ml
pH 7,5	

LB agar	
LB médium	1000 ml
agar	15 g

ISP2 médium + CaCO ₃	
kvasničný extrakt	4 g
sladový extrakt	10 g
glukosa	4 g
CaCO ₃	2 g
dH ₂ O	do objemu 1000 ml
pH 7,2	

ISP2 agar + CaCO ₃	
ISP2 médium + CaCO ₃	1000 ml
agar	15 g

YEME médium	
kvasničný extrakt	3 g
pepton	5 g
sladový extrakt	3 g
glukosa	3 g
dH ₂ O	do objemu 1000 ml
pH 7,2	
<i>po sterilizaci přidat</i> 2,5M MgCl ₂	2 ml

AVM médium	
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
kvasničný extrakt	2 g
NaCl	2 g
K ₂ HPO ₄	50 mg
CaCO ₃	5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	50 mg
MnSO ₄ ·H ₂ O	31 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	100 mg
dH ₂ O	880 ml
pH 7,4	
<i>po sterilizaci přidat</i> 25% glukosa	120 ml

4.1.4 Pufry, roztoky a standardy

Pufr	Složení
SM pufr	5,8 g NaCl, 2,0 g MgSO ₄ · 7H ₂ O, 50 ml 1M Tris/HCl (pH 7,5), 5 ml 2% roztoku želatiny, doplnit dH ₂ O do objemu 1000 ml
TE pufr	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
TE⁻¹ pufr	10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0
TAE pufr pro DNA elektroforézu	40 mM Tris-acetát; 1 mM EDTA; pH 8,0
10× DNA vzorkový pufr pro DNA elektroforézu	100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 20% glycerol, 0,002% bromfenolová modř, pH 8,0
Ligační pufr	10× koncentrovaný pufr pro T4 DNA ligasu (New England BioLabs)
Restrikční pufr	10× koncentrovaný pufr pro restrikční endonukleasu, pro každý enzym byly použity pufry doporučené výrobcem, NEB2 nebo NEB3 (New England Biolabs)
Pufr pro CIP	10× koncentrovaný pufr CutSmart® (New England BioLabs)
Pufr pro polymerasu	10× LA complete PCR pufr (Top-Bio) 10× Taq pufr bez MgCl ₂ (Top-Bio)

Zásobní roztoky antibiotik (Sigma-Aldrich) rozpuštěné v H ₂ O, 1000 × koncentrované			
název	koncentrace zásobního roztoku	Pracovní koncentrace	Využití
ampicilin	100 mg/ml	100 µg/ml	Antibiotika byla použita pro selekci buněk knihovny (buňky <i>E.coli</i> VCS 257 transfekované vektorem SuperCos I ligovaným s fragmenty chDNA)
kanamycin	30 mg/ml	30 µg/ml	

Standard molekulových velikostí pro DNA agarosovou elektroforézu: 1kb PLUS DNA ladder (Invitrogen)
Standard obsahuje 20 fragmentů od 100 bp do 12000 bp (100, 200, 300, 400, 500, 650, 850, 1000, 1650, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000 a 12000).
Roztok standardu byl připraven přesně dle návodu výrobce.

4.1.5 Komerční soupravy

Izolace DNA z agarosového gelu:

GENECLEAN® Turbo Kit (MP Biomedicals)

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

Izolace kosmidové DNA:

Plasmid DNA Purification NucleoBond® Xtra Midi/Maxi (Macherey-Nagel)

Přečištění kosmidové DNA a DNA z PCR směsi:

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

Příprava kosmidové knihovny:

SuperCos I Cosmid Vector Kit (Stratagene)

Gigapack III Gold Packaging Extract (Agilent Technologies)

Příprava sekvenační knihovny:

TruSeq® DNA PCR-Free Library Preparation Kit

Agilent DNA 7500 Kit

4.1.6 Oligonukleotidy

Použití oligonukleotidů	Označení	Sekvence (uváděna v orientaci 5'→3')
Ověření taxonomického zařazení producenta imazepinů	27 f	AGAGTTTGATCMTGGCKCAG
	783 r-abc *	a) CTACCAGGGTATCTAATCCTG b) CTACCGGGGTATCTAATCCCG c) CTACCCGGGTATCTAATCCGG
	EubB	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
	1492 r	TACGGYTACCTTGTTACGACTT
Vyhledávání limazepinového biosyntetického genového shluku	lim 1	GCCGTCTTCCTGCACAAG
	lim 3	CCACGAAGTCCGCCAACC
Sekvenování krajů inzertů v kosmidu	T3	GCAATTAACCCTCACTAAAGG
	T7	TAATACGACTCACTATAGGG
Primer na dosekvenování inzertu	Limna19	CACCACACTCCTCACGCCGTTG

* primer 783 r byl použit jako ekvimolární směs složek a), b), c)

Primery 27 f, 783 r-abc, EubB, 1492 r, lim1 a lim 3 byly dodány firmou Sigma-Aldrich, primery T3 a T7 byly získány ze Střediska sekvenování DNA, MBÚ AV ČR, od Jürgena Felsberga, CSc. Primer Limna19 byl syntetizován firmou Macrogen.

4.1.7 Software

antiSMASH (<http://antismash.secondarymetabolites.org>) „**Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell**“: online nástroj pro vyhledávání genových shluků sekundárního metabolismu v již anotovaných sekvencích genomů.

Artemis (<https://www.sanger.ac.uk/resources/software/artemis>): program pro práci se sekvencemi DNA, umožňující manuální anotaci sekvencí.

BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) „**Basic Local Alignment Search Tool**“: nástroj pro porovnávání sekvencí a hledání podobností mezi jednotlivými sekvencemi.

ChemSketch 12.01: program používaný pro tvorbu chemických vzorců a schémat.

FGENESB

(<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenesb&group=programs&subgroup=gfindb>): nástroj pro vyhledávání/predikci genů.

GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>): databáze sekvencí, která sloužila především pro vyhledávání genů biosyntetických shluků PBD.

Geneious Pro 5.5.6.: program používaný pro práci se sekvencemi DNA.

NRPSpredictor 2 (<http://nrps.informatik.uni-tuebingen.de/>): je online nástroj pro stanovení neribosomálních kódů A-domén.

RAST (<http://rast.nmpdr.org>) „**Rapid Annotation using Subsystem Technology**“: nástroj určený pro anotaci genomů.

4.2 Metody

4.2.1 Kultivace bakterií

4.2.1.1 Kultivace buněk *Micrococcus* ICBB 8177 pro analýzu pomocí UHPLC-UV-MS

Kultivace buněk pro UHPLC-UV-MS byla provedena v rámci paralelního projektu Mgr. Stanislavem Kadlčíkem, Ph.D. Buňky byly kultivovány v AVM a YEME (s MgCl_2 bez sacharosu) médiu v 500 ml baňkách s plochým dnem.

První generace buněk byla zaočkována zisky (s ISP2 agarem) a pěstována v 50 ml YEME média 1 den při 28 °C. Touto kulturou (2 ml) bylo inokulováno 38 ml YEME média a ve druhém případě 38 ml AVM (s přidavkem 5,2 ml 25% glukosy). Buňky byly kultivovány 5 dnů při 28 °C a následně centrifugovány 15 min při pokojové teplotě, 5000×g. Dále byl analyzován pouze supernatant (zamrazen a uchováván při -20 °C).

4.2.1.2 Kultivace buněk *Micrococcus* ICBB 8177 pro izolaci chDNA

Kultivace probíhala v Erlenmayerových baňkách s vtlačenými hranami pro zabránění tvorby shluků mycelia. Inokulum bylo připraveno zaočkováním 2 × 25 ml YEME média (v 250 ml baňkách) buňkami kmene *Micrococcus* ICBB 8177 (narostlými na ISP2 agaru) a kultivací na rotační třepačce při 230 RPM po dobu 4 dnů při 28 °C. Touto kulturou (1 ml) bylo zaočkováno 10 × 50 ml YEME média v Erlenmayerových baňkách o objemu 500 ml, rovněž s vtlačenými hranami. Buňky byly kultivovány 4 dny za stejných podmínek.

4.2.1.3 Kultivace buněk *E. coli* JM109

Buňky byly transformovány kosmidovou DNA pro namnožení vektoru SuperCos I. Kultivace probíhala při 37 °C, 200 RPM s přidavkem antibiotika ampicilinu.

4.2.1.4 Kultivace buněk *E. coli* VCS 257

Buňky *E. coli* VCS 257 byly při přípravě kosmidové knihovny transfekovány ligační směsí. Buňky byly kultivovány v tekutém LB médiu nebo na LB agarových plotnách při 37 °C, po transfekci s přidavkem antibiotika kanamycinu.

4.2.2 Identifikace limazepinů metodou UHPLC-UV-MS (Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s UV detekcí a hmotností spektrometrií)

UHPLC je analytická separační metoda. Dělení látek probíhá na chromatografické koloně, která je naplněna vhodnou stacionární fází. Vzorek je nanesen na kolonu a následně unášen mobilní fází. Každá látka ve směsi interaguje se stacionární fází odlišným způsobem, proto separované látky prochází kolonou odlišnou rychlostí a tím se odlišují jejich retenční časy. Když dělená složka opouští kolonu, je ještě analyzována pomocí UV/VIS detekce a hmotnostní spektrometrie (MS). MS stanovuje hmotu analyzované látky měřením poměru hmoty/náboj (m/z) jejího iontu ve vakuu. UHPLC-UV-MS analýzu, včetně vyhodnocení dat, provedl kolega Mgr. Zdeněk Kameník, Ph.D.

Supernatant kultivačního média byl extrahován na pevné fázi pomocí kolonky HLB 3cc (60 mg; Waters). Kolonka se byla před nanesením vzorku kondicionována 3 ml methanolu a ekvilibrována 3 ml H₂O. Poté na ni bylo naneseno 3 ml supernatantu a byla promyta 3 ml H₂O. Látky zachycené na sorbentu byly eluovány 1,5 ml methanolu. Eluát byl vysušen na rotační vakuové odparce a následně byl rozpuštěn v 600 µl 50% methanolu. Takto připravený vzorek byl analyzován pomocí ultraúčinného kapalinového chromatografu Acquity UPLC vybaveného detektorem diodového pole PDA 2996 a LCT Premier XE hmotnostním spektrometrem s analyzátozem doby letu (Waters, USA). Vzorek o objemu 5 µl byl dávkován na kolonu Acquity BEH C18 (50 mm × 2,1 mm; 1,7 µm; Waters; USA) a eluován dvousložkovou mobilní fází – A: 0,1% HCOOH v H₂O a B: methanol nebo acetonitril. Separace probíhala při teplotě kolony 40°C, průtokové rychlosti 0,4 ml min⁻¹ a za použití následujícího lineárního gradientového programu (min/% B): 0/5; 1,5/5; 15/90 při použití methanolu nebo 0/5; 1,5/5; 15/70 při použití acetonitrilu. Po ukončení gradientového programu byla kolona promyta (99% B, 1 min) a ekvilibrována (5% B; 1,5 min). Podmínky

detekce hmotnostního spektrometru byly následující: napětí na kapiláře +2800 V; napětí na vstupu do analyzátoru, + 40 V; teplota bloku iontového zdroje, 120 °C; teplota desolvatačního plynu – dusíku, 350 °C; průtok desolvatačního plynu, 800 L h⁻¹; průtok dusíku při vstupu do analyzátoru, 50 L h⁻¹. Záznam hmotnostního detektoru byl pořízen ve W módu v rozsahu hodnot m/z 100–1000. Doba skenu byla 0,15 s, doba mezi skeny činila 0,01 s (při vstupu referentní látky, 0,1 s). Jako referentní látka pro udržení přesné hmoty v průběhu měření (<5 ppm) byl použit leucin-enkefalin (2 ng μl^{-1} , 5 $\mu\text{l min}^{-1}$). Data byla vyhodnocena programem MassLynx 4.0 software (Waters, USA).

4.2.3 Transformace buněk *E. coli* JM109 kosmidovou DNA teplotním šokem

Transformace je děj, při kterém kompetentní buňky bakterií přijímají cizorodou DNA z prostředí. Metoda teplotního šoku je založená na principu náhlých změn teplot působících na bakteriální buňku. Při přestupu z chladného prostředí do prostředí podstatně teplejšího dochází v bakteriální membráně k vytvoření pórů, kterými může cizorodá DNA pronikat dovnitř buněk.

Pomocí této metody byl namnožen vektor SuperCos I, který byl následně použit při přípravě genomové knihovny. Do 100 μl suspenze kompetentních buněk bylo přidáno minimálně 100 ng kosmidové DNA (objem přidávaného roztoku DNA 1-10 μl). Suspenze byla ponechána 30 minut v ledu. Následně byly buňky přeneseny na 60 s do 42 °C vodní lázně, čímž byly vystaveny teplotnímu šoku. Po uplynutí této doby byly buňky inkubovány 1-2 min v ledu. Poté byl k buňkám přidán 1 ml LB média předeřátého na 37 °C, buňky byly kultivovány 1 h při teplotě 37 °C. Po tuto dobu dochází k dělení buněk a expresi rezistenčních genů, které jsou přítomny na kosmidu (ampicilin, kanamycin). Buňky byly vysety na misku s LB agarem obsahujícím antibiotikum ampicilin, přes noc byly inkubovány při 37 °C

4.2.4 Izolace chromozomální DNA (chDNA)

Pro izolaci chDNA producenta limazepinů (*Micrococcus* ICBB 8177) byla použita metoda dle Hopwood a kol. (Hopwood *et al*, 1985) a upravená podle Vachalova a kol. (Vachalova *et al*, 1995). Oproti komerčním soupravám pro izolaci chDNA je tato metoda časově náročnější, umožňuje však izolaci většího množství DNA (0,5 – 2 mg na 1 g mycelia) o lepší kvalitě (A_{260}/A_{230} a A_{260}/A_{280} v rozmezí 1,8 – 2,0) s nízkým stupněm fragmentace (velikost fragmentů převážně nad 40 kbp). Nízký stupeň fragmentace je důležitým faktorem pro přípravu kvalitní kosmidové knihovny.

- 1) Mycelium bylo centrifugováno 15 min při 4 °C, 5000×g. Získaný buněčný pelet byl 2× promyt roztokem TE. Centrifugace mezi promývacími kroky probíhala při stejných podmínkách.
- 2) Následující protokol odpovídá 10 g buněk. Tyto buňky byly resuspendovány v 50 ml roztoku TE. Následně bylo přidáno podle protokolu 0,1 g lysozymu, inkubace probíhala 30 minut při 30 °C ve vodní lázni. K dostatečné lyzi buněk došlo až po dodatečném přidání dalších 0,1 g lysozymu a navýšení teploty na 37 °C po dobu 20 min.
- 3) K buňkám bylo přidáno 12 ml 0,5M EDTA, pH 8,0 (do konečné koncentrace EDTA 0,1M) a 1,3 ml roztoku proteinasy K (konečná koncentrace proteinasy K v roztoku byla 0,2 mg/ml), inkubace probíhala 5 minut při 30 °C.
- 4) Následně bylo přidáno 7 ml 10% SDS (do konečné koncentrace 0,1M). Inkubace trvala do úplného projasnění suspenze (přibližně 10 minut) při 30 °C.
- 5) K inkubační směsi bylo přidáno 35 ml neutrálního fenolu a výsledný roztok byl třepán v ruce 10 minut, poté bylo přidáno 35 ml chloroformu. Roztok byl třepán dalších 5 minut a poté centrifugován 15 min při 4 °C, 5000×g. Vodná fáze byla odebrána pipetou a celý tento krok 5) byl zopakován.
- 6) Vodná fáze byla důkladně vytřepána se 70 ml chloroformu. Roztok byl centrifugován opět 15 min při 4 °C, 5000×g. Následně byla opět odebrána vodná fáze (80 ml).

- 7) K 80 ml vodné fáze bylo přidáno 800 μ l roztoku RNasy A o koncentraci 4 mg/ml (výsledná koncentrace RNasy A byla 40 μ g/ml). Inkubace probíhala 1 hodinu při 37 °C.
- 8) Ve sterilní 250 ml kádince bylo přibližně 20 ml roztoku chDNA převrstveno 40 ml isopropanolu. Vysrážená DNA byla navinuta na sterilní skleněné tyčinky. Pro každých 20 ml roztoku chDNA byla použita nová tyčinka. Tyčinky s navinutou DNA byly promyty v 80% ethanolu. Po zaschnutí byla každá tyčinka vložena do 20 ml TE, DNA byla rozpouštěna přes noc při 4 °C.
- 9) Následující den bylo ke každé tyčince přidáno dalších 20 ml TE a po dostatečném promíchání byl roztok DNA srážen po 10 ml alikvotách převrstvením 20 ml isopropanolu stejným způsobem jako v bodě 8). Poté byla DNA vždy ze 2 tyčinek rozpuštěna ve 4 ml TE přes noc při 4 °C.

Kvalita získané DNA byla prověřena DNA elektroforézou a proměřením na nanodropu (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, USA).

4.2.5 Izolace kosmidové DNA vazbou na aktivované sklo

Preparace kosmidové DNA byla prováděna přesně podle návodu komerčně dodávané soupravy Plasmid DNA Purification NucleoBond® Xtra Midi / Maxi. Principem metody je vazba záporně nabitě kosmidové DNA na kolonky pokryté kladně nabitými funkčními skupinami (methyl-amino-ethanolem). Následnými promývacími kroky je DNA přečištěna a nakonec eluována roztokem o vysoké iontové síle a alkalizací pH (tím dochází k neutralizaci kladně nabitě kolonky a kosmidová DNA je uvolněna). DNA je z roztoku získána alkoholovým srážením.

Kosmidy byly izolovány podle protokolu Midi ze 100 ml kultury buněk *E. coli* JM109 kultivované přes noc při 37 °C. Výtěžek kosmidové preparace byl prověřen DNA elektroforézou a proměřením koncentrace na nanodropu.

4.2.6 Příprava kosmidové knihovny (SuperCos I, Cosmid Vector Kit)

4.2.6.1 Příprava ligační směsi

Izolovaná chDNA kmene *Micrococcus* ICBB 8177 byla parciálně naštěpena (v jedné reakci bylo štěpeno vždy 100 µg chDNA) enzymem BamHI při 37 °C tak, aby byl největší podíl fragmentů nad hranicí 12 kbp. Pro nalezení optimální doby štěpení byla provedena testovací reakce, kdy byla chDNA štěpena po dobu 2, 6, 8, 10, 12, 15, 20 a 30 min. Nejlepší výsledek byl získán po 12 min štěpení. Velikost restričních fragmentů byla testována elektroforézou v 0,8% agarosovém gelu. Fragmenty DNA požadované velikosti byly izolovány vyříznutím a přečištěním komerční soupravou GENE CLEAN® Turbo Kit. Konce naštěpené DNA byly následně defosforylovány (1h při 37 °C) pomocí CIP. Defosforylované fragmenty byly dále přečištěny **fenol-chloroformovou extrakcí**:

- a) Roztok DNA byl smíchán v poměru 1:1 se směsí fenol:chloroform:isoamylalkohol (25:24:1), tato směs byla třepána v ruce 10 min.
- b) Následovala centrifugace 15 min při 4 °C, 5000×g.
- c) Vodná fáze byla opatrně odebrána a poté smíchána s chloroformem v poměru 1:1, směs byla opět třepána po dobu 10 min. Roztok byl dále centrifugován při stejných podmínkách jako v bodě b). Vodná fáze byla odebrána.
- d) K vodné fázi byla přidána 0,1 objemu 3M NaAc (pH 5,2) a 2,5 objemu 96% ethanolu.
- e) DNA byla srážena přes noc při 4 °C, následovala centrifugace 16000×g, 10 min, 4 °C.
- f) Supernatant byl odstraněn a pelet promyt 70% ethanolem. Po centrifukaci (16000×g, 5 min, 4 °C) byl pelet vysušen ve vakuu při 42 °C a rehydratován v 50 µl TE pufru.

Vektor SuperCos I byl linearizován enzymem XbaI (2 h při 37 °C), opračován CIP (1h při 37 °C). Správnost štěpení byla prověřena DNA elektroforézou v 1% agarosovém gelu. Produkt štěpení a defosforylace byl přečištěn soupravou Wizard® Plus SV Gel and PCR DNA Clean-Up System. Následovalo další štěpení linearizovaného defosforylovaného vektoru enzymem BamHI (1h při 37 °C) s následným přečištěním produktu restrikční reakce stejnou komerčně dodávanou soupravou. Takto opračovaný vektor byl znovu prověřen DNA elektroforézou. Do takto připraveného vektoru byly ligovány fragmenty chDNA přes BamHI místa.

4.2.6.2 Ligace opračovaného vektoru SuperCos I a štěpené chDNA

Štěpený a defosforylovaný vektor byl ligován s parciálně štěpenou chDNA pomocí T4 DNA ligasy přes noc při 4 °C.

Ligační směs	
chDNA parciálně štěpená BamHI/CIP	2,5 µg
SuperCos I opračovaný XbaI/ CIP/BamHI	1 µg
ligační pufr 10 × koncentrovaný	2,0 µl
10mM ATP	2,0 µl
H ₂ O	doplnit do 20 µl
1 µl byl odebrán na kontrolní elektroforézu	
Ke zbývajícím 19 µl přidána T4 DNA ligasa	1 µl

4.2.6.3 Pakážování a transfekce ligační směsi (Gigapack III Gold packaging extrakt)

Výsledná ligační směs fragmentů chromozomální DNA a štěpeného vektoru byla pakážována pomocí Gigapack III Gold packaging extrakt (který preferenčně zabaluje velké fragmenty DNA 37-50 kbp) a následně transfekována do buněk *E. coli* VCS 257.

4.2.6.3.1 Příprava buněk *E. coli* VCS 257 pro transfekci

Buňky byly pěstovány přes noc na misce s LB agarem, následující den byly zaočkovány do 20 ml LB média s 0,2% maltosou a 10 mM MgSO₄ a kultivovány při 37 °C, 200RPM, do OD₆₀₀=0,9-1 (přibližně 5 h). Bakteriální suspenze byla centrifugována 10 min, 500×g. Pelet byl následně resuspendován v 10 ml 10 mM MgSO₄ a dále naředěn sterilním 10 mM MgSO₄ na OD₆₀₀=0,5.

4.2.6.3.2 Pakážování a transfekce

Po dobu kultivace hostitelských buněk *E. coli* VCS 257 byla ligační směs (1-4 µl obsahující 0,1-1,0 µg ligované DNA) vmíchána k pakážovacímu extraktu (Gigapack III Gold packaging extrakt). Po důkladném promíchání byla výsledná směs inkubována při 22 °C po dobu 2 h. Poté bylo přidáno 500 µl SM pufru a 20 µl chloroformu pro ukončení pakážovací reakce. Roztok byl krátce centrifugován a supernatant obsahující fágy byl dále smíchán s buňkami naředěnými v 10 mM MgSO₄ na OD₆₀₀=0,5 v poměru 1:1 (vždy 120 µl buněk a stejný objem fágového extraktu). Směs byla inkubována 30 min při pokojové teplotě. Ke každé reakční směsi bylo přidáno 940 µl LB média vyhřátého na 37 °C. Následovala inkubace v třepačce v 37 °C, 1 h, 200 RPM. Buňky byly následně centrifugovány a resuspendovány ve 100 µl čerstvého LB média. Každých 50 µl takto resuspendovaných buněk bylo vyseto na misku s LB agarem a s přidavkem antibiotika kanamycinu (30 µg/ml). Buňky byly vysety celkem na 10 misek, kultivace probíhala přes noc při 37 °C.

4.2.6.4 Zamrazení kosmidové knihovny jako glycerolové konzervy

Narostlé kolonie z každé misky byly smyty 6 ml LB média. Získané buňky ze všech deseti misek byly smíchány v jedné sterilní nádobě. K suspenzi buněk byl přidán glycerol do konečné koncentrace 20 % a ampicilin do finální koncentrace 100 µg/ml. Takto připravená knihovna byla rozdělena na alikvóty po 1 ml a zamrazena při -80 °C.

4.2.6.5 DNA elektroforéza v agarosovém gelu

DNA elektroforéza je separační metoda sloužící k analýze a dělení fragmentů DNA na základě odlišných délek. Je založena na principu putování záporně nabitě DNA v elektrickém poli ke kladně nabitě elektrodě. Elektroforetická analýza probíhala ve většině případů v 1% agarosovém gelu v TAE pufru pod napětím 3-5 V/cm. Pro izolaci fragmentů DNA z gelu a dělení parciálně štěpené chDNA byl použit 0,8% agarosový gel. Pro zviditelnění DNA byl do gelu přidáván roztok ethidium bromidu o konečné koncentraci 0,005%.

Vzorky byly na gel nanášeny po přidání 10× koncentrovaného vzorkového pufru. Jako standard byl používán 1kb PLUS DNA ladder.

4.2.6.6 Izolace fragmentů DNA z agarosového gelu

Izolace DNA z agarosového gelu byla využívána při přípravě kosmidové knihovny za účelem izolace fragmentů DNA o určité velikosti po parciálním štěpení chDNA restričním enzymem. Po elektroforéze byla z gelu vyříznuta pouze ta oblast, která obsahovala fragmenty DNA požadované velikosti. Purifikace DNA z agarosového gelu byla prováděna komerčně dodávanou soupravou GENE CLEAN® Turbo Kit přesně podle návodu od výrobce. Principem metody je vazba DNA na křemičitou membránu (GLASSMILK®) v podmínkách vysoké iontové síly, po promytí je DNA uvolněna roztokem o nízké iontové síle (sterilní H₂O nebo pufr s nízkou iontovou silou). Tato souprava byla využita zejména pro schopnost přečištění dlouhých fragmentů DNA, až do velikosti 300 kbp.

4.2.6.7 Přečišťování kosmidové DNA (po štěpení a defosforylaci) a přečišťování PCR produktů

Komerčně dostupná souprava The Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System je určena k přečišťování fragmentů DNA (o velikosti od 100bp do 10kb) po PCR reakcích například před sekvenováním, stejně tak slouží k izolaci DNA z agarosových gelů po elektroforéze. Během přípravy genomové knihovny byla tato souprava použita pro přečišťování kosmidové DNA po štěpení restričními endonukleasami a po defosforylaci. Principem metody je vazba DNA na křemičitou membránu v podmínkách vysoké iontové síly. Po promytí je DNA uvolněna díky nízké iontové síle elučního roztoku – dH₂O.

4.2.7 Polymerasová řetězová reakce (PCR)

PCR je metoda používaná k *in vitro* amplifikaci specifického úseku molekuly DNA (tzv. templátu). Jednou z esenciálních složek reakční směsi jsou synteticky připravené primery, nukleotidové sekvence komplementární každá k jednomu kraji amplifikovaného úseku. Samotná reakce probíhala v PCR-cykleru (T1 Thermocycler 96, Biometra, Německo). Byla použita 2 uspořádání reakce, klasická PCR, kde byla jako templát používána izolovaná DNA

a koloniová PCR. U koloniové PCR se jako templát nepoužívá izolovaná DNA, ale přímo bakteriální buňky (*E.coli* VCS 257 z připravené kosmidové knihovny), které genetickou informaci obsahují.

1) Ověření taxonomického zařazení producenta limazepinů (*Micrococcus* sp. ICBB 8177) na základě sekvence 16S rDNA

Porovnávání sekvencí 16S rDNA je běžným nástrojem při taxonomické identifikaci mikroorganismů. PCR reakce byla provedena ve dvojím uspořádání, vždy s jinou dvojicí primerů s chDNA *Micrococcus* sp. ICBB 8177 jako templátem. Pro první reakci byly zvoleny primery (27 f/783 r-abc), do druhé reakce byly přidány primery (EubB/1492 r), které byly také použity autory publikace při taxonomické identifikaci producenta limazepinů (Fotso *et al*, 2009). Primery 27 f a EubB rozpoznávají totožné místo 16S rDNA, jejich sekvence se liší pouze záměnou jednoho nukleotidu. DNA produkty těchto dvou paralelních PCR se tedy odlišují pouze délkou, primery 27 f/783 r-abc amplifikují kratší úsek 16S rDNA. Složení reakční směsi a reakční podmínky jsou uvedeny v tabulce 3.

reakční směs		podmínky PCR		
forward primer 27 f (10 pmol/μl) (ve 2. paralelní reakci EubB)	2 μl	94 °C	5 min	
reverse primer 783 r-abc (10 pmol/μl) (ve 2. paralelní reakci 1492 r)	2 μl	72 °C	Pauza	
BSA	3 μl	94 °C	1 min	34 cyklů
MgCl ₂ (25 mM)	3 μl	57 °C	45 s	
dNTP (10 mM)	1 μl	72 °C	1,5 min	
Taq pufr 10× bez MgCl ₂	5 μl	72 °C	5 min	
DMSO	2,5 μl			
chDNA (100 ng/μl)	1 μl			
H ₂ O	29,5 μl			
Taq purple polymerasa (1 U/μl)	1 μl			

Tabulka 3. Složení reakční směsi a reakční podmínky při ověřování taxonomického zařazení producenta limazepinů na základě 16S rDNA.

2) Koloniová PCR

Koloniová PCR byla použita při vyhledávání genového shluku pro biosyntézu limazepinů v kosmidové genomové knihovně. Templátem byly vždy jednotlivé kolonie knihovny *E.coli* VCS 257. Pro PCR byly použity primery lim1/lim3, které slouží k amplifikaci části modulu NRPS, zodpovědného

za připojení APD podjednotky při biosyntéze limazepinů. Vzniká produkt velký přesně 1300 bp pokrývající část A-domény a sousedící C-domény. Tyto primery byly navrženy Mgr. Stanislavem Kadlčíkem, Ph.D. v rámci předchozího projektu. Primery lim1/lim3 jsou specifické a byly navrženy na základě sekvence získané pomocí degenerovaných primerů (navržených na základě porovnávání již známých sekvencí NRPS PBD sluků). Složení reakční směsi a reakční podmínky koloniové PCR jsou uvedeny v tabulce 4.

Podobnou PCR reakcí byla testována přítomnost limazepinového biosyntetického sluku v celé kosmidové knihovně. V takové reakci bylo templátem 5 µl suspenze kompletní knihovny, dále byly použity stejné složky reakční směsi jako v tabulce 4, pouze bylo upraveno množství H₂O, aby byl celkový objem reakce 50 µl.

(Jako pozitivní kontrola byla prováděna PCR reakce s primery lim1/lim3 s 1 µl chDNA *Micrococcus* sp. ICBB 8177 jako templátem. Složení reakční směsi bylo stejné, jako uvádí tabulka 4 pouze bez buněk kosmidové knihovny.)

reakční směs	
forward primer lim 1 (10 pmol/μl)	2 μl
reverse primer lim 3 (10 pmol/μl)	2 μl
betain	25 μl
dNTP (10 mM)	2 μl
LA pufr 10×	5 μl
DMSO	2,5 μl
nonidet	0,5 μl
H ₂ O	10 μl
LA polymerasa (5 U/μl)	0,5 μl
buňky kolonií <i>E. coli</i> kosmidové knihovny	

podmínky PCR		
94 °C	5 min	
68 °C	Pauza	
94 °C	1 min	35 cyklů
57 °C	1 min	
68 °C	1,5 min	
68 °C	7 min	

Tabulka 4. Složení reakční směsi a reakční podmínky při koloniové PCR.

4.2.8 Prohledávání (screening) knihovny

Pro výsev na misky byla suspenze buněk jedné alikvóty kosmidové knihovny ředěna 1 000 000x, na jednu misku bylo vyseto 200 µl takto ředěné suspenze. Přes noc byly buňky kultivovány při 37 °C, poté byly jednotlivé kolonie testovány pomocí koloniové PCR s primery lim1/lim3. Pro případ pozitivního výsledku PCR byly všechny testované kolonie přeočkovávány pro další použití (izolaci kosmidu).

4.2.9 Sekvenování DNA

4.2.9.1 Sekvenování Sangerovou metodou

Sekvenování DNA bylo prováděno servisně. Sekvenování 16S rDNA, ověření přítomnosti limazepinového biosyntetického shluku v chDNA kmene *Micrococcus* ICBB 8177 a v kosmidové knihovně, dále také ověření pozitivních výsledků koloniové PCR a sekvenování okrajů inzertů vektoru SuperCos I bylo provedeno Sangerovou metodou u společnosti GATC Biotech (Německo).

Výjimkou bylo sekvenování vnitřního úseku inzertu kosmidu pozitivního na přítomnost limazepinového biosyntetického shluku z nově navrženého primeru Limna19. Sekvenování bylo provedeno firmou MacroGen (Holandsko), protože tato společnost nabízí službu syntézy primeru s následným sekvenováním (U společnosti GATC, stejně tak i u firmy MacroGen bylo sekvenováno přístrojem ABI 3730xl).

4.2.9.2 Sekvenování metodou Illumina

Sekvenování celého kosmidu a posléze i celého genomu bylo provedeno metodou Illumina přístrojem MiSeq. Sekvenační knihovna byla připravena v naší laboratoři přesně podle protokolu komerčně dodávané soupravy TruSeq® DNA PCR-Free Library Preparation Kit. Samotné sekvenování provedla firma GeneTiCA s.r.o. v Praze.

V prvním kroku přípravy sekvenační knihovny byla DNA fragmentována přístrojem Bioruptor® Plus (Diagenode, Belgie, fragmentace sonikací, 18 cyklů při nastavení „high frequency“). Míra fragmentace závisí na výběru protokolu pro přípravu knihovny. V našem případě byla zvolena varianta pro 550 bp dlouhé

fragmenty sekvenační knihovny. Takový protokol vyžaduje 2 µg vstupní DNA. Po fragmentaci následuje zatupení konců DNA a selekce fragmentů požadované velikosti. Dalším krokem je adenylace 3' konců a ligace adaptorů, které jsou k adenylované DNA komplementární díky jednonukleotidovému 'T' přesahu na svém 3' konci. Velikost DNA fragmentů připravené knihovny byla prověřena přístrojem 2100 Bioanalyzer, Agilent DNA 7500 Kit (Agilent Technologies, USA).

4.2.10 Bioinformatická analýza

Kratší sekvence DNA získané sekvenací kosmidu i genomu přístrojem MiSeq byly složeny do delších sekvencí (assembling) Mgr. Tomášem Větrovským z laboratoře environmentální mikrobiologie, MBÚ AV ČR. K tomuto účelu byly použity programy Velvet 1.2.10, Bowtie2 a Khmer.

4.2.10.1 Analýza genového shluku pro biosyntézu limazepinů

Výslednou sekvenci kosmidu tvořily 2 fragmenty/kontigy. Nejprve byly programem FGENESB predikovány ORF (otevřené čtecí rámce) obou kontigů. V tomto programu byl jako nejpříbuznější mikroorganismus zvolen kmen *Streptomyces avermitilis* MA-4680. Jednotlivé ORF byly analyzovány pomocí BLAST a na základě této analýzy byly stanoveny geny, které pravděpodobně náleží limazepinovému biosyntetickému shluku. Celý genový shluk pro biosyntézu limazepinů byl přítomen v jedné části sekvence, sekvence druhého kontigu odpovídala pouze kosmidové DNA.

Navržené ORF limazepinového biosyntetického shluku byly porovnávány pomocí BLAST s již známými geny biosyntézy PBD. Geny doposud nedetekované v biosyntetických shlucích PBD byly porovnávány s jejich nejpříbuznějšími homology. Na základě analýzy BLAST byly navrženy hypotetické funkce proteinů kódovaných limazepinovým biosyntetickým genovým shlukem a byly predikovány hranice tohoto shluku. V rámci této diplomové práce byl sekvenován celý genom kmene *Micrococcus* ICBB 8177, pro přesnější stanovení hranic byl genový shluk pro biosyntézu limazepinů vyhledán v sekvenci genomu, čímž bylo umožněno analyzovat jeho širší okolí. Pro práci se sekvencí genomu byl používán program Geneious.

Genový shluk pro biosyntézu limazepinů byl uložen do databáze GenBank pomocí nástroje BankIt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/index.cgi?tool=genbank>). Nejprve zde byla vložena kompletní sekvence limazepinového biosyntetického shluku, následně byly v BankIt manuálně vyznačeny a popsány pozice jednotlivých ORF.

4.2.10.2 Analýza genomu producenta limazepinů (*Micrococcus* sp. ICBB 8177)

Po zpracování (assembling) byla sekvence genomu kmene *Micrococcus* sp. ICBB 8177 tvořena 28 kontigy. Genom byl následně anotován nástrojem RAST (Aziz *et al*, 2008; Brettin *et al*, 2015; Overbeek *et al*, 2014).

Důležité parametry programu RAST byly nastaveny následujícím způsobem:

doména: **bakterie**

rod: ***Streptomyces***

druh: **sp.**

genetický kód: **11**

schéma: **Classic RAST**

„gene caller“: **RAST**

FIGfam verze: **Release70**

automatické opravy chyb: ✓

oprava čtecího rámce: ✓

sestavit metabolický model: ✓

zaplnit mezery (odhad chybějících genů): ✓

Pro vyhledání genových shluků biosyntézy sekundárních metabolitů přítomných v genomu *Micrococcus* sp. ICBB 8177 za účelem detekce možného dalšího alternativního genového shluku pro biosyntézu limazepinů byl použit program antiSMASH (Blin *et al*, 2013; Medema *et al*, 2011; Weber *et al*, 2015). Anotovaný genom byl do programu antiSMASH vložen v EMBL formátu.

Program antiSMASH byl nastaven následujícím způsobem:

povolit ClusterFinder algoritmus: ✓

porovnání (BLAST) s ostatními genovými shluky:

BLAST analýza genových shluků: ✓

BLAST analýza známých genových shluků: ✓

BLAST analýza podshluků: ✓

mCOG analýza: ✓

predikce aktivních míst: ✓

PFAM analýza: ✓

predikce EC (Enzyme Commission) označení: ✓

metabolický model sestaven dle: ***S. coelicolor***

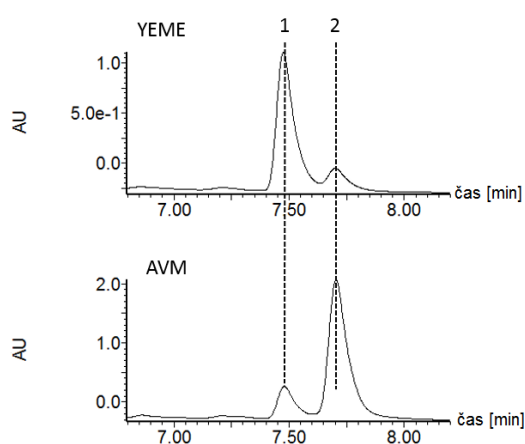
5. VÝSLEDKY

5.1 Ověření identity kmene *Micrococcus* sp. ICBB 8177

Kmen *Micrococcus* sp. ICBB 8177 byl získán z laboratoře Prof. Taifo Mahmuda, Oregon State University. Morfologické znaky obdrženého kmene, jako například vláknitý růst, tvorba vzdušného mycelia a sporulace, neodpovídaly charakteristikám rodu *Micrococcus*. Proto bylo před zahájením experimentů ověřeno, zda se jedná skutečně o kmen, který byl v publikaci popsán jako producent limazepinů (Fotso *et al*, 2009). Pomocí UHPLC-UV-MS (Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s UV detekcí a hmotností spektrometrií) byla ověřena schopnost tohoto kmene produkovat limazepiny, následně bylo prověřeno taxonomické zařazení produkčního kmene sekvenací 16S rDNA.

5.1.1 Identifikace limazepinů metodou UHPLC-UV-MS

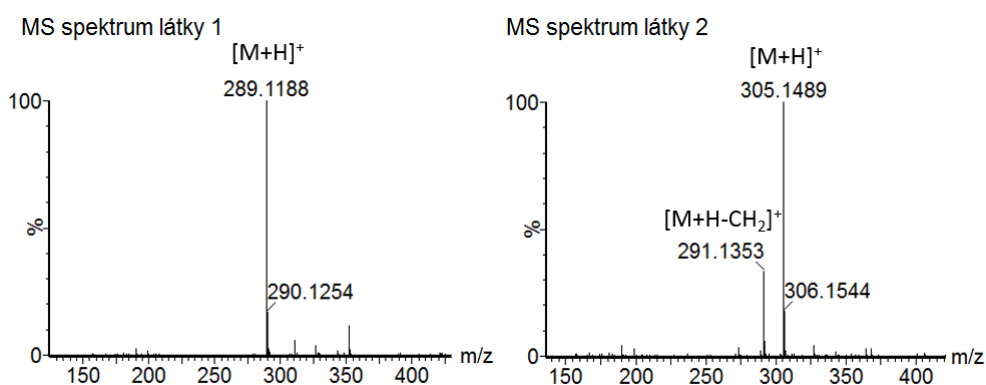
Analýza UHPLC-UV-MS byla provedena kolegou Mgr. Zdeňkem Kameníkem, Ph.D. Produkce limazepinů byla ověřována v různých kultivačních médiích (YEME a AVM). Pomocí UV detektoru byly v těchto médiích detekovány dvě majoritní látky, látka 1 a 2, které by dle UV spektra mohly odpovídat limazepinům (Obrázek 15). Zajímavé je, že poměr látek 1 a 2 byl opačný u média YEME v porovnání s AVM médiem.



Obrázek 15. UV chromatogramy extrahované pro vlnovou délku 300 nm. Byly detekovány dvě majoritní látky 1 a 2, které pravděpodobně odpovídají limazepinům.

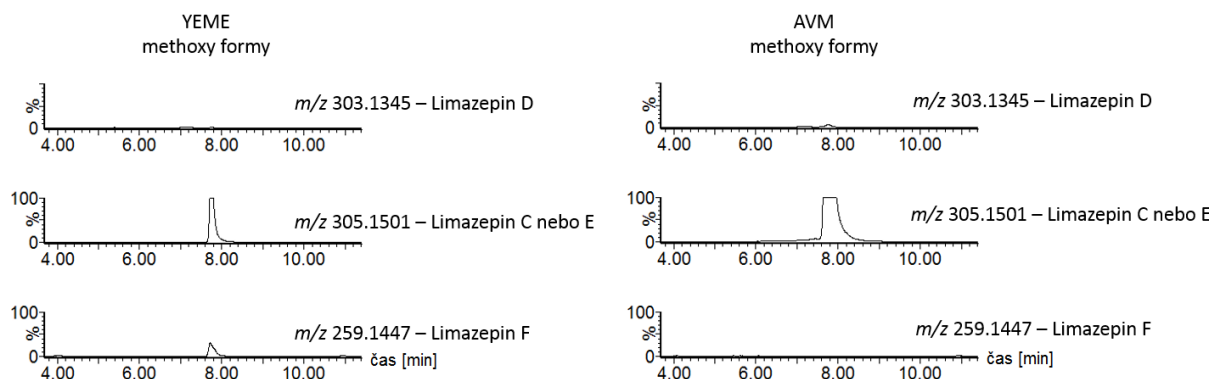
Detekované látky 1 a 2 byly dále analyzovány pomocí LC-MS. Pro analýzu byl jako složka mobilní fáze použit methanol, ve kterém limazepiny převážně přechází z hemiaminal a imino formy do methoxy formy. Vedle methoxy formy mohou být také detekovány oxo deriváty limazepinů, které do methoxy formy přejít nemohou.

- **MS spektrum látky 1** (Obrázek 16) odpovídá buď hemiaminal formě limazepinu D nebo oxoformám limazepinu C nebo E. První možnost (limazepin D) lze vyloučit, protože nebyla detekována odpovídající methoxy forma (Obrázek 16). Bude se tedy jednat o oxoformu limazepinu C nebo E, které methoxy formu netvoří. Na základě LC-MS analýzy nelze jednoznačně určit, o který z těchto dvou izomerů se jedná (tyto látky se liší pouze polohou dvojné vazby a mají tudíž identickou relativní molekulovou hmotnost).
- **MS spektrum látky 2** (Obrázek 16) odpovídá methoxy formě limazepinu C nebo E. Také v tomto případě nelze určit, o kterou z těchto dvou látek se jedná.



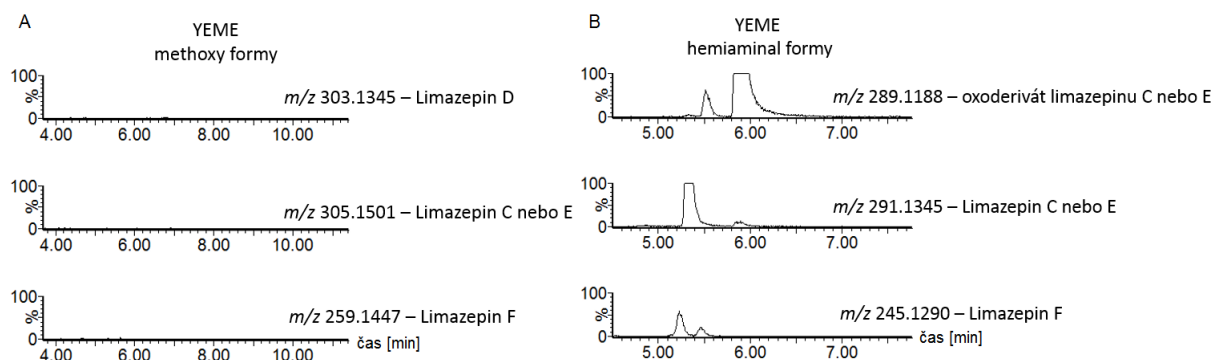
Obrázek 16. MS spektrum látky 1 a 2. MS spektrum látky 1 odpovídá pravděpodobně oxoformě limazepinu C nebo E. MS spektrum látky 2 odpovídá methoxy formě limazepinu C nebo E.

Pomocí citlivější MS detekce jsme se pokusili zjistit, zda se ve vzorku nenachází ještě nějaký minoritní limazepin. Proto byly extrahovány LC-MS chromatogramy pro konkrétní ionty odpovídající methoxy formám limazepinů (Obrázek 17). Z chromatogramů je patrné, že limazepin D není ve vzorku obsažen ani na základě MS detekce a naopak pozorujeme výrazný pík odpovídající limazepinu C nebo E, který byl ovšem detekován již pomocí UV detekce. Dále byl detekován limazepin F, který se ve vzorku nachází v nízké koncentraci, proto nebyl detekován pomocí UV, ale pomocí MS ano, pouze však při kultivaci v YEME médiu.



Obrázek 17. LC-MS chromatogramy extrahované pro konkrétní ionty odpovídající methoxy formám různých limazepinů.

Pokud není v mobilní fázi přítomen methanol, neměli bychom detekovat methoxy formy limazepinů. Pokud je tedy methanol nahrazen acetonitrilem, ionty detekované v případě použití methanolu (m/z 305 a 259) nepozorujeme (Obrázek 18A). Při použití acetonitrilu jako mobilní fáze bychom měli detekovat převážně hemiaminal formy limazepinů. V případě použití acetonitrilu opravdu detekujeme odpovídající hemiaminal formy limazepinu C nebo E a limazepinu F (Obrázek 18B). Ion 289 neodpovídá hemiaminal formě limazepinu D, protože pro něj nebyla detekována methoxyforma v případě použití methanolu (Obrázek 17), jedná se tedy zřejmě o oxoformu limazepinu C nebo E, jak již bylo zmíněno. Dva izomery (2 píky) u iontů 291 a 245 zřejmě poukazují na dvě možné konfigurace na uhlíku C11. V případě iontu 289 se může jednat o důsledek keto-enol tautomerie oxoskupiny.



Obrázek 18. Extrahované LC-MS chromatogramy pro konkrétní ionty odpovídající různým formám limazepinů. Jako mobilní fáze byl místo methanolu použit acetonitril.

Dle UHPLC-UV-MS analýzy byly detekovány 2 majoritní PBD látky, limazepin C nebo E a oxoderivát limazepinu C nebo E. Jako minoritní PBD byl dále detekován limazepin F. Publikovaný limazepin D detekován nebyl.

5.1.2 Ověření taxonomického zařazení producenta limazepinů (*Micrococcus* sp. ICBB 8177)

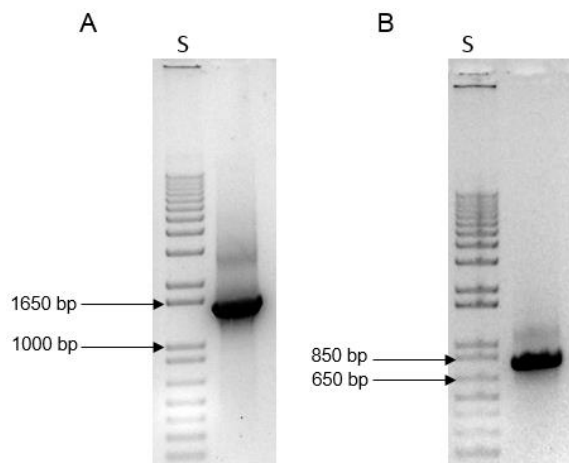
Taxonomické zařazení bylo ověřeno sekvenací 16S rDNA. Pro amplifikaci 16S rDNA byly použity dva odlišné páry primerů, primery 27 f/783 r-abc, standardně používané v naší laboratoři a druhý pár primerů EubB/1492 r, který byl použit autory publikace při taxonomické identifikaci kmene (Fotso *et al*, 2009). Jako templát byla použita chDNA *Micrococcus* sp. ICBB 8177. Obě získané sekvence 16S rDNA dle BLAST analýzy odpovídaly rodu *Streptomyces*.

Produkt PCR reakce s primery 27 f/783 r-abc (Obrázek 19) byl sekvenován z primeru 27 f. Získaná sekvence o velikosti 723 nukleotidů vykazovala dle BlastN analýzy nejvyšší stupeň homologie se sekvencí 16S rDNA *Streptomyces* sp. 8-39 (E value 0.0, Identita 97%, přístupový kód v GenBank: JQ782962).

PCR produkt získaný s využitím primerů EubB/1492 r (Obrázek 19) byl sekvenován z primeru EubB, sekvence DNA o délce 1084 vykazovala dle analýzy BlastN nejvyšší homologii se sekvencí 16S rDNA kmene *Streptomyces* sp. Aac-12 (E value 0.0, Identita 98%, přístupový kód v GenBank: AB180761).

Obě získané sekvence 16S rDNA se značně lišily od publikované sekvence pro kmen *Micrococcus* sp. ICBB, která je zveřejněna v GenBank pod přístupovým kódem: FJ194442 (Fotso *et al*, 2009) a opravdu odpovídá rodu *Micrococcus*.

Kmen, který jsme získali od autorů publikace, je skutečně producentem limazepinů, avšak publikované taxonomické zařazení je pravděpodobně chybné. Dle morfologických znaků i sekvence 16S rDNA se jedná o mikroorganismus rodu *Streptomyces*. Autoři publikace byli informováni a přislíbili revizi záznamu v databázi. Nicméně vzhledem k tomu, že dosud publikovaný název kmene producenta limazepinů *Micrococcus* sp. ICBB 8177 je jediným identifikačním prostředkem, bude v této práci i nadále používán.



Obrázek 19. PCR produkty amplifikace 16S rDNA s primery EubB/1492 r (A) a 27 f/783 r-abc (B) určené k sekvenování.

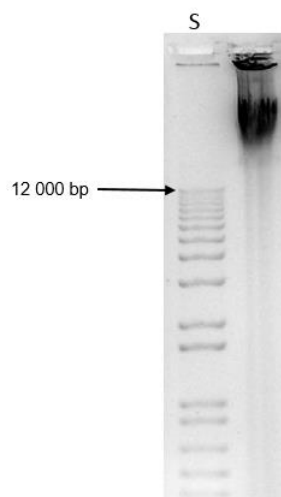
S: Standard velikosti DNA

5.2 Izolace a identifikace shluku genů pro biosyntézu limazepinů

5.2.1 Příprava kosmidové knihovny

5.2.1.1 Příprava chDNA (izolace chDNA a parciální štěpení)

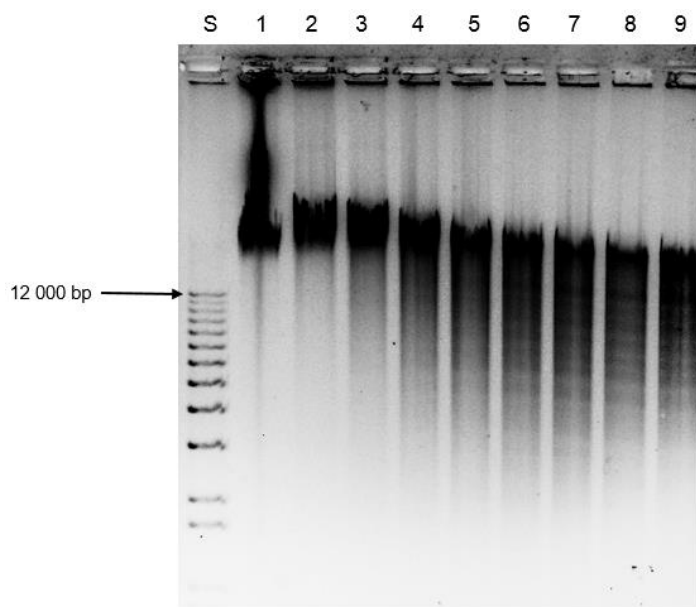
Bylo izolováno 7,2 mg chDNA z 10 g čerstvého mycelia buněk kmene *Micrococcus* sp. ICBB 8177 o dostačující čistotě ($A_{260}/A_{280}=1,73$, $A_{260}/A_{230}=1,79$) a nízké fragmentaci (Obrázek 20).



Obrázek 20. Kontrola celistvosti izolované chDNA kmene *Micrococcus* sp. ICBB 8177.

S: Standard velikosti DNA

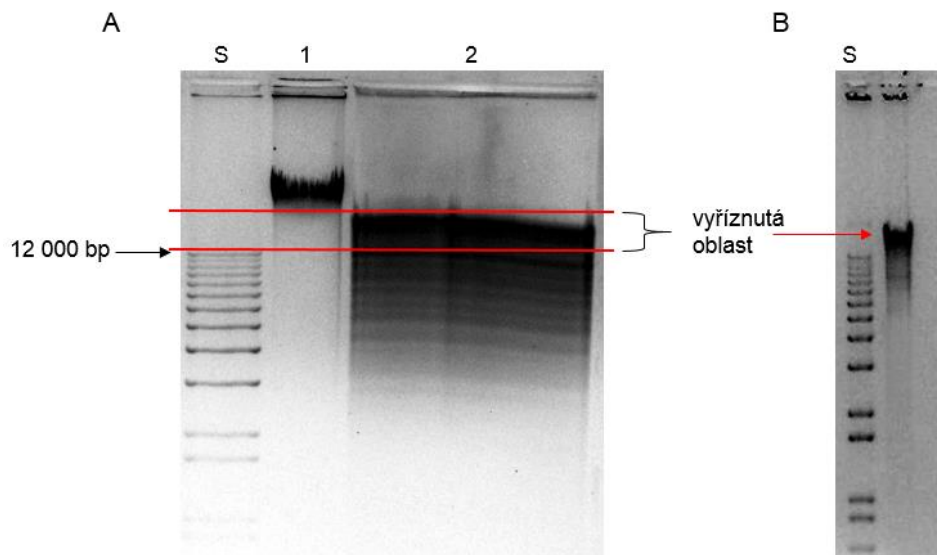
Pro přípravu kosmidové knihovny byla chDNA *Micrococcus* sp. ICBB 8177 parciálně naštěpena. Optimální doba štěpení chDNA enzymem BamHI byla nejprve testována (Obrázek 21). Jako optimální doba působení restričního enzymu BamHI bylo stanoveno 12 min, protože právě po 12 min je největší podíl fragmentů stále v oblasti nad 12 kbp a přítomnost neštěpené chDNA je omezena na minimum.



Obrázek 21. Testování optimální doby štěpení chDNA *Micrococcus* sp. ICBB 8177 restriční endonukleasou BamHI. Čísla 1-9 odpovídají jednotlivým testovacím reakcím o různých délkách působení restriční endonukleasy na chDNA.

- | | |
|--------------------|---------------------------|
| 1) neštěpená chDNA | 6) 12 min |
| 2) 2 min | 7) 15 min |
| 3) 6 min | 8) 20 min |
| 4) 8 min | 9) 30 min |
| 5) 10 min | S: Standard velikosti DNA |

V každé reakci bylo štěpeno vždy 100 µg chDNA. Část gelu obsahující fragmenty požadované velikosti byla vyříznuta (na Obrázku 22 A, červeně vyznačená oblast) a DNA byla z gelu izolována. Výtěžek DNA po restrikci a purifikaci byl velice nízký (průměrně 1 µg na reakci). Pro získání dostatečného množství fragmentů DNA pro přípravu kosmidové knihovny bylo nutné provést 43 paralelních restričních reakcí (příklad 1 reakce na Obrázku 22 A). Získané alikvóty parciálně štěpené a přečištěné chDNA byly sloučeny, DNA byla následně defosforylována a přečištěna fenol-chloroformovou extrakcí. Celkem bylo výtěženo 7,1 µg purifikované fragmentované DNA vhodné velikosti (výsledný produkt Obrázek 22 B) a dostatečné čistoty ($A_{260}/A_{280}=2,26$; $A_{260}/A_{230}=1,74$).



Obrázek 22. Parciální restrikce chDNA kmene *Micrococcus* sp. ICBB 8177 restrikční endonukleasou BamHI.

A) 1) neštěpená chDNA

2) Produkt štěpení restrikční endonukleasou BamHI po 12 min. Oblast gelu s fragmenty většími než 12 kbp byla vyříznuta (oblast vyznačená červeně).

B) Výsledný produkt po štěpení enzymem BamHI, následné izolaci z gelu, defosforylaci a fenol-chloroformové extrakci.

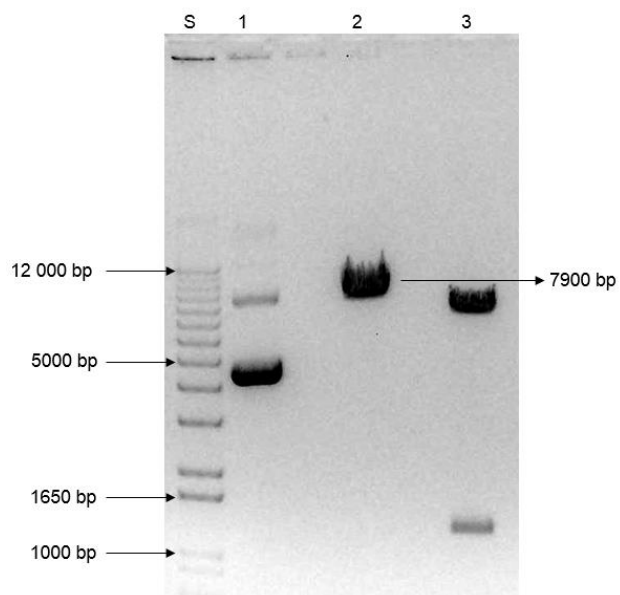
S: Standard velikosti DNA

5.2.1.2 Příprava kosmidové DNA (vektor SuperCos I) a vlastní konstrukce knihovny

Vektor SuperCos I byl transformován do buněk *E. coli* JM109. Pro izolaci kosmidu bylo použito 100 ml buněčné suspenze kultivované přes noc. Kosmidová DNA byla izolována s výtěžkem 35,1 μg (čistota $A_{260}/A_{280}=1,85$; $A_{260}/A_{230}=2,09$).

25 μg kosmidové DNA bylo štěpeno restrikční endonukleasou XbaI a defosforylováno. Štěpená a defosforylovaná DNA byla přečištěna a následně štěpena restrikční endonukleasou BamHI (Obrázek 23). Po přečištění byl celkový výtěžek kosmidové DNA 6,9 μg DNA (čistota: $A_{260}/A_{280}=1,90$; $A_{260}/A_{230}=2,16$). Takto opracovaný vektor byl ligován s připravenými fragmenty parciálního štěpení chDNA. Ligační směs byla následně pakována a transfekována do buněk *E. coli* VCS 257.

Pro výsev naisky byly transfekované buňky rozděleny na 10 rovnocenných dílů. Buňky byly kultivovány přes noc při 37 °C, celkem vyrostlo 1200 kolonií.



Obrázek 23. Štěpení vektoru SuperCos 1 restrikčními endonukleasami.

1) neštěpený vektor SuperCos I

2) SuperCos I po štěpení restrikční endonukleasou XbaI a defosforylaci pomocí CIP

3) SuperCos I po štěpení XbaI, defosforylaci CIP a následném štěpení BamHI.

S: Standard velikosti DNA

5.2.2 Zhodnocení pokrytí genomu kosmidovou knihovnou

Pro výpočet pravděpodobnosti pokrytí genomu kosmidovou knihovnou byla použita následující rovnice dle Clarke & Carbon (Clarke & Carbon, 1976).

$$P=1-(1-F)^N$$

P je pravděpodobnost, se kterou se všechny žádané fragmenty vyskytnou v knihovně sestávající z N klonů (kolonií). F je část genomu reprezentovaná průměrným klonem (podíl průměrné velikosti inzertu a celkové velikosti genomu).

Pro výpočet P bude:

$F=(36 \times 10^3)/10^7$ (do vektoru SuperCos 1 jsou přednostně vkládány fragmenty DNA o délce 30-42 kbp, proto byla pro výpočet použita průměrná velikost inzertu 36 kbp, velikost genomu byla odhadnuta na 10 Mbp na základě průměrné velikosti již známých genomů *Streptomyces*)

N= 1200 (po transfekci buněk *E. coli* VCS 257 narostlo celkem 1200 kolonií)

$$P=1-(1-0,0036)^{1200}$$

$$P=0,99$$

⇒ S pravděpodobností 99% pokrývá kosmidová knihovna celý genom kmene *Micrococcus* sp. ICBB 8177.

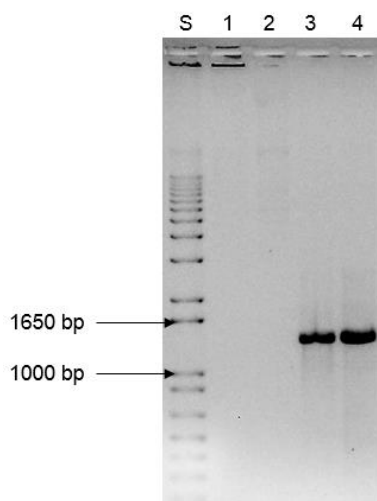
5.2.3 Testování přítomnosti limazepinového biosyntetického shluku v kosmidové knihovně

Genový shluk pro biosyntézu imazepinů byl v kosmidové knihovně vyhledáván metodou koloniové PCR. Jako marker byl zvolen gen pro NRPS, protože tento gen musí být v genovém shluku pro biosyntézu limazepinů zcela jistě přítomen. NRPS totiž katalyzují zásadní krok biosyntézy PBD, kondenzaci dvou aminokyselinových prekurzorů, anthranilátové a ve většině případů APD podjednotky. Kosmidová knihovna byla prohledávána specifickými primery lim1/lim3, jejichž PCR produkt pokrývá sekvenci odpovídající části A-domény a těsně sousedící C-domény NRPS rozpoznávající APD podjednotku v biosyntéze limazepinů. Primery lim1/lim3 byly navrženy Mgr. Stanislavem Kadlčíkem, Ph.D. v rámci předchozího projektu.

Nejprve byla pomocí PCR s primery lim1/lim3 (Obrázek 24) ověřena přítomnost genového shluku pro biosyntézu limazepinů v kompletní kosmidové knihovně (kosmidová knihovna byla v tomto případě použita jako templát). Délka získaných amplifikovaných fragmentů DNA odpovídala očekávané velikosti 1300 bp (Obrázek 24). Produkt PCR byl sekvenován pro ověření zachycení správné specifické sekvence. Sekvence byla porovnána s již dříve sekvenovanou limazepinovou A a C-doménou (sekvenoval Mgr. Stanislav Kadlčík, Ph.D.). 100% identita sekvencí potvrdila přítomnost alespoň části limazepinového biosyntetického shluku v knihovně. Získaná sekvence (o délce 1179 nukleotidů) byla dále analyzována pomocí BlastX. Nejblížeším homologem byl protein TomB, NRPS z tomaymycinového biosyntetického shluku (*Streptomyces achromogenes*, E value 2e-82, Identita 47%). Na základě těchto výsledků byla potvrzena vhodnost využití primerů lim1/lim3 při vyhledávání limazepinového biosyntetického shluku v kosmidové knihovně.

Jako pozitivní kontrola byla provedena reakce s primery lim1/lim3 na chDNA *Micrococcus* sp. ICBB 8177. Produkt této PCR byl rovněž sekvenován a i v tomto případě byla získána správná sekvence odpovídající části A a C-domény limazepinové NRPS.

Ve dvou paralelních reakcích byly jako templát testovány buňky *E. coli* VCS 257 a vektor SuperCos I pro vyloučení nasedání primerů na kosmidovou DNA nebo na chDNA transfekovaných buněk (*E.coli* VCS 257).

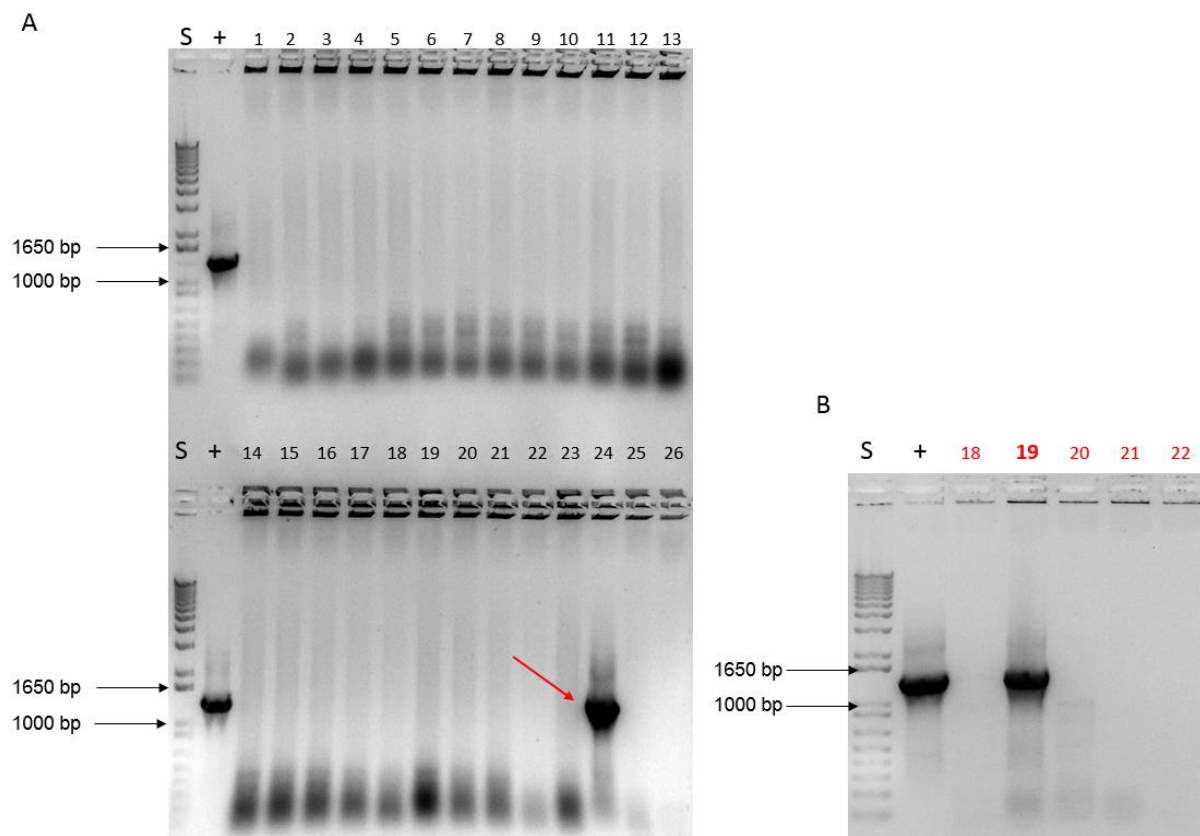


Obrázek 24. Testování primerů lim1/lim3 na chDNA kmene *Micrococcus* sp. ICBB 8177 a na kosmidové knihovně.

- 1) negativní kontrola: Produkt PCR s buňkami *E. coli* VCS 257 jako templátem
 - 2) negativní kontrola: Produkt PCR, kde byla jako templát kosmidová DNA (SuperCos I)
 - 3) pozitivní kontrola: Produkt PCR s chDNA izolovanou z producenta limazepinů (*Micrococcus* sp. ICBB 8177) jako templátem.
 - 4) Produkt PCR, kde byla jako templát použita kompletní kosmidová knihovna.
- S: Standard velikosti DNA

5.2.4 Vyhledávání limazepinového biosyntetického shluku v kosmidové knihovně

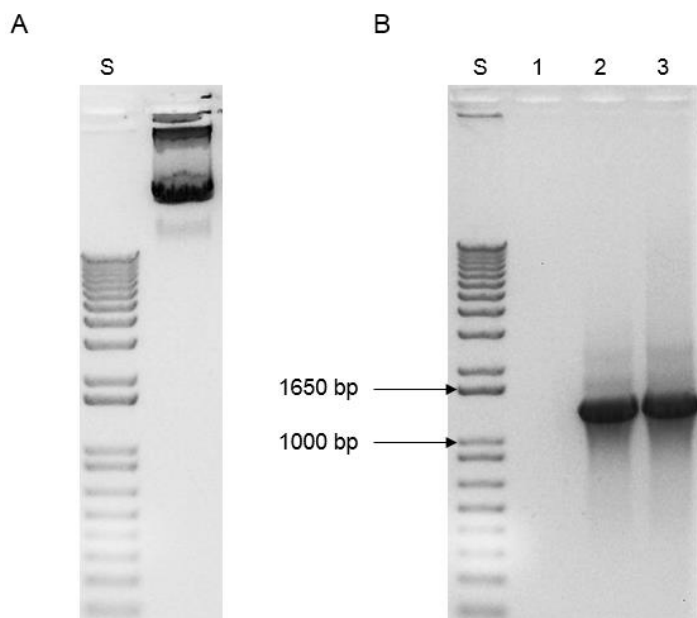
Kosmidová knihovna byla nejprve naředěna 1 000 000x a 200 µl takto ředěné knihovny bylo vyseto na miskou. Jednotlivé čerstvě narostlé kolonie byly testovány metodou koloniové PCR s primery lim1/lim3. V každé reakci bylo najednou testováno 5 kolonií. V případě pozitivního signálu byla provedena další série reakcí, kdy byla každá kolonie testována zvlášť pro detekci jednoho konkrétního pozitivního klonu. Celkem bylo analyzováno přes 900 kolonií, z toho 1 byla detekována jako pozitivní. Produkt PCR s pozitivní kolonií jako templátem byl sekvenován pro vyloučení falešně pozitivního výsledku. Získaná sekvence byla analyzována pomocí BlastX a porovnána s již dříve sekvenovanou částí limazepinové NRPS, čímž bylo potvrzeno zachycení správné sekvence. Pro další manipulaci byl pozitivní klon označen číslem **19** (nalezení této kolonie dokládá Obrázek 25).



Obrázek 25. Vyhledání limazepinového biosyntetického shluku v kosmidové knihovně

- A) Vzorky 1-26: Produkty koloniové PCR, v každé reakci bylo testováno dohromady 5 kolonií. Vzorek 24: Produkt koloniové PCR, kde v pěti testovaných koloniích byl nalezen pozitivní klon (označeno červenou šipkou). Pětice testovaných klonů z reakce 24 byla testována další sérií PCR pro zjištění jedné konkrétní pozitivní kolonie (Obrázek 25 B).
- B) Přítomnost limazepinového biosyntetického genového shluku byla detekována v kolonii **19**.
- S: Standard velikosti DNA
- +: Pozitivní kontrola: chDNA z producenta limazepinů jako templát.

Kosmidová DNA z kolonie 19 byla izolována ze 100 ml buněčné kultury kultivované přes noc (výtěžek 149 µg, $A_{260}/A_{280}=1,92$; $A_{260}/A_{230}=2,08$, Obrázek 26 A). Přítomnost limazepinového biosyntetického shluku v tomto kosmidu byla znovu potvrzena PCR s primery lim1/lim3 (Obrázek 26 B). Tento kosmid byl označen jako **SCLim**.



Obrázek 26. Izolovaný kosmid SCLim (A) a ověření přítomnosti limazepinového biosyntetického shluku v tomto kosmidu (B).

B) 1) negativní kontrola: Produkt PCR, do které byla přidána sterilní H₂O místo templátové DNA.

2) pozitivní kontrola: Produkt PCR, kde byla použita jako templát chDNA (*Micrococcus* sp. ICBB 8177)

3) Produkt PCR, kde byl jako templát přidán kosmid SCLim.

5.2.5 Identifikace inzertu vloženého do vektoru SCLim

Vektor SCLim byl analyzován sekvenováním obou konců vloženého inzertu z univerzálních primerů T3 a T7. Primery odpovídají sekvencím T3 a T7 promotoru, které jsou v kosmidu lokalizovány v těsné blízkosti klonovacího místa pro vkládání inzertu. Dle analýzy BlastX (Tabulka 5) vykazovala sekvence získaná z primeru T7 nejvyšší stupeň homologie se sekvencí odpovídající ribonuklease HI (*Streptomyces* sp. NRRL WC-3742). Sekvence získaná z primeru T3 vykazovala dle BlastX analýzy vysoký stupeň podobnosti se sporulačními proteiny Spo0J, superrodiny ParBc.

Metodou primer walking (primer Limna19) byl dále identifikován i následující gen inzertu, jehož sekvence odpovídá sekvenci genu tomA, který kóduje jednu z NRPS v genovém shluku pro biosyntézu příbuzného PBD tomaymycinu

Aktivity enzymu Rnasy HI i sporulačních proteinů Spo0J jsou typické pro primární metabolismus, proto je velice pravděpodobné, že limazepinový biosyntetický shluk bude v kosmidu SCLim obsažen celý. Předpokládána

přítomnost celého genového shluku pro biosyntézu limazepinů v kosmidu SCLim byla následně potvrzena sekvenací.

Sekvenováno z primeru	Nejbližší homolog (BlastX)	Přístupový kód pro homolog (GenBank)	% identity/ podobnosti	Hodnota E (E value)	Hodnota Q (Query cover)
T7	Ribonukleasa HI (<i>Streptomyces</i> sp. NRRL WC-3742)	WP_037971845	78/82	4e-50	65%
T3	hypotetický protein z ParBc superrodiny (<i>Streptomyces sclerotialis</i>)	WP_037773350	75/79	4e-18	65%
Limna19	NRPS TomA (<i>Streptomyces achromogenes</i>)	ACN39014	42/54	2e-18	36%

Tabulka 5. BLAST analýza sekvencí okrajových oblastí inzertu kosmidu SCLim.

5.3 Sekvenční analýza limazepinového biosyntetického shluku

5.3.1 Hranice genového shluku pro biosyntézu limazepinů

Celý kosmid SCLim byl sekvenován servisně (coverage 45,6×). Po zpracování sekvencí (assembling, provedl Mgr. Tomáš Větrovský) z přístroje MiSeq byla sekvence SCLim tvořena dvěma fragmenty/kontigy, jeden kontig odpovídal pouze kosmidové DNA, druhý fragment obsahoval geny limazepinového biosyntetického shluku. Inzert vložený do vektoru SCLim byl dlouhý 39252 bp včetně shluku genů pro biosyntézu limazepinů. Hranice inzertu byly stanoveny na základě vyhledání BamHI klonovacího místa, které leží v těsné blízkosti T3 a T7 sekvencí kosmidu SuperCos I. Jednotlivé ORF inzertu byly stanoveny programem FGENESB, následně analyzovány pomocí BlastX, čímž byly predikovány funkce jednotlivých kódovaných proteinů. Na základě této analýzy byly navrženy hranice genového shluku pro biosyntézu limazepinů.

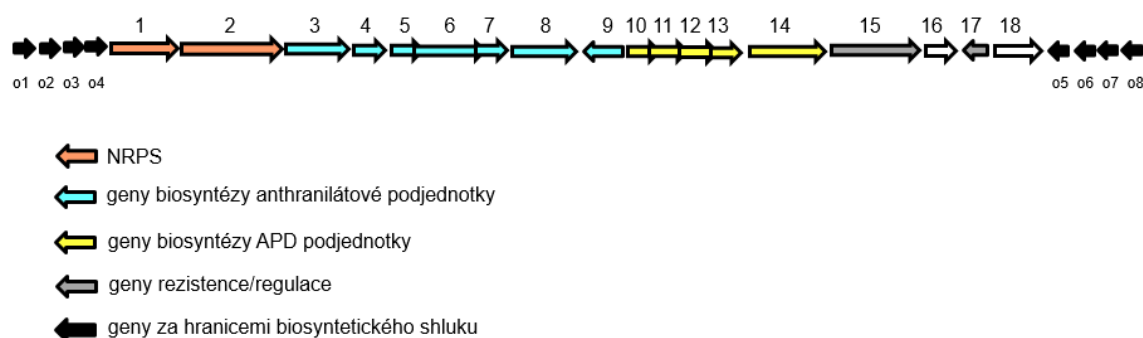
Později, v rámci této diplomové práce, byl sekvenován genom kmene *Micrococcus* sp. ICB 8177. Pro zmapování širšího okolí limazepinového biosyntetického shluku byl následně v sekvenci genomu tento biosyntetický shluk vyhledán (viz dále).

Následující text uvádí popis ORF, odpovídajících nejbližšímu okolí genového shluku pro biosyntézu limazepinu. Jednotlivé geny byly analyzovány pomocí BlastX (geny odpovídají schématu na obrázku 27 a také tabulce 6).

Gen *o4*, ležící v těsné blízkosti shluku genů pro biosyntézu limazepinů vykazuje dle BlastX analýzy vysoký stupeň homologie se sporulačními proteiny Spo0J, superrodiny ParBc. Gen *o3* je dle BlastX homologický s diguanylát cyklasami. Gen *o2* je dle BlastX homologní s desaturasami mastných kyselin a *o1* vykazuje nejvyšší stupeň homologie s 3-oxoacyl-ACP synthasou.

Dále gen *o5* dle BlastX vykazuje vysoký stupeň homologie s membránovými přenašeči iontů typu KefB, které zprostředkovávají antiport K^+/H^+ . Dalším analyzovaným genem je *o6*, který kóduje protein dle analýzy BlastX homologický cytochromu P450. Následuje gen *o7* podle BlastX vysoce homologický s oxidasami 2-hydroxy kyselin a gen *o8*, který kóduje protein dle BlastX vykazující vysoký stupeň homologie s proteiny pyridin nukleotid-disulfid oxidoreduktasami. Aktivita proteinů kódovaných geny *o1* – *o8* nebyly očekávány v dráze biosyntézy limazepinů.

Na základě navržených hranic je shluk genů pro biosyntézu limazepinů, tedy úsek zahrnující geny *lim1* – *lim18* dlouhý 25568 bp a obsahuje 18 hypotetických genů (Obrázek 27). Program FGENESB na tomto úseku původně detekoval 19 ORF, ale po analýze BlastX a editaci sekvencí, byl jeden predikovaný gen kódující hypotetický protein o délce pouze 28 aminokyselin vyřazen.



Obrázek 27. Schéma limazepinového biosyntetického shluku. Čísla nad schématem odpovídají genům *lim1* – *lim18*. Geny, které nebyly přiřazeny do biosyntetického shluku a leží v jeho těsné blízkosti, byly označeny *o1* – *o8*. Bílé šipky představují geny kódující proteiny, jejichž funkce v biosyntéze limazepinů nebyla objasněna.

gen	Nejbližší homolog (BlastX)	Přístupový kód pro homolog (GenBank)	% identity/ podobnosti	Hodnota E (E value)
o1	3-oxoacyl-ACP synthasa (<i>Streptomyces griseofuscus</i>)	WP_037657344	74/83	0.0
o2	desaturasa mastných kyselin (<i>Streptomyces</i> sp. NRRL S-37)	WP_030857685	41/54	1e-70
o3	diguanylat cyklasa (<i>Streptacidiphilus albus</i>)	WP_034089494	82/89	5e-118
o4	protein ParBc superrodiny, Spo0J sporulační protein (<i>Amycolatopsis alba</i>)	WP_026467799	51/63	1e-99
o5	kation:proton antiporter KefB (<i>Streptacidiphilus jeojiense</i>)	WP_030262790	70/79	0.0
o6	cytochrom P450 (<i>Streptacidiphilus jeojiense</i>)	WP_037597453	62/72	0.0
o7	oxidasa 2-hydroxy kyselin (<i>Streptomyces</i> sp. R1-NS-10)	WP_019075683	70/82	8e-154
o8	pyridin nukleotid-disulfid oxidoreduktasa (<i>Streptomyces yogyakartensis</i>)	WP_046088363	69/77	0.0

Tabulka 6. Sekvenční analýza genů, které leží za hranicemi limazepinového biosyntetického shluku.

5.3.2 Analýza genů limazepinového biosyntetického shluku

Sekvence genového shluku pro biosyntézu limazepinu byla uložena v GenBank pod přístupovým kódem **KT381463** a bude zveřejněna souběžně s publikací.

Limazepinový biosyntetický shluk o velikosti 25568 bp obsahuje 18 hypotetických genů, označených *lim1* – *lim18*, z toho 14 genů má své homology v genovém shluku pro biosyntézu tomaymycinu (Tabulka 7). Tomaymycinový shluk je limazepinovému ze všech již sekvenovaných PBD biosyntetických shluků nejpodobnější (s anthramycinovým a porothramycinovým biosyntetickým shlukem sdílí limazepinový biosyntetický shluk 9 homologních genů, se sibiromycinovým pouze 8 genů). Tři geny z tomaymycinového biosyntetického shluku v limazepinovém biosyntetickém shluku své homology nemají (*tomN*, *tomO*, *tomP*). Gen *tomN* kóduje pravděpodobně enzym tautomerasu, *tomO* NADH-dependentní flavinovou oxidoreduktasu a *tomP* anthranilát syntasu. Oproti tomaymycinovému, genový shluk pro biosyntézu limazepinů obsahuje další 4 geny navíc, *lim4*, *lim5*, *lim16*, *lim17*, tyto geny budu popsány v následujícím textu.

Limazepinový biosyntetický shluk obsahuje geny *lim1* a *lim2* odpovídající jednoznačně NRPS, klíčovým enzymům biosyntézy PBD. Jejich nejbližšími homology jsou geny *tomA* a *tomB* z tomaymycinového biosyntetického shluku.

Dále bylo identifikováno 5 genů (*lim10*, *lim11*, *lim12*, *lim13* a *lim14*), vykazujících homologii s geny biosyntézy APD podjednotky nejen PBD, ale i dalších shluků biosyntézy látek inkorporujících do své struktury APD (Hofer *et al*, 2011; Hu *et al*, 2007; Koberska *et al*, 2008; Li *et al*, 2009a; Li *et al*, 2009b; Najmanova *et al*, 2014), proto byly geny *lim10* – *lim14* přiřazeny k biosyntéze APD podjednotky také v případě limazepinů. Dle BlastX, *lim10* (homolog *tomH*) kóduje protein homologický s L-DOPA-2,3 dioxygenasou a *lim11* s tyrosin hydroxylasou (*tomI*). Gen *lim12* kóduje protein na základě BlastX analýzy vysoce homologický s F-420-dependentní reduktasou (*tomJ*), protein kódovaný genem *lim13* vykazuje vysoký stupeň homologie s enzymem isomerasou (*tomK*) a *lim14* s γ -glutamyltransferasou (*tomL*). Soubor genů biosyntézy APD podjednotky limazepinů odpovídá zastoupení genů biosyntézy APD podjednotky tomaymycinu. V obou případech chybí gen pro methyltransferasu z biosyntézy APD, což je logické, protože v biosyntéze tomaymycinu i limazepinů je inkorporována APD podjednotka s dvouuhlíkatým postranním řetězcem místo tříuhlíkatého a chybějící methyltransferáza je právě odpovědná za připojení chybějícího třetího uhlíku. Do skupiny genů zapojených v biosyntéze APD podjednotky je v případě biosyntézy tomaymycinu řazen také gen *tomN* (Li *et al*, 2009a), který kóduje pravděpodobně enzym tautomerasu. Homolog genu *tomN* nebyl detekován v limazepinovém biosyntetickém shluku, ani v ostatních již sekvenovaných biosyntetických shlucích obsahujících geny biosyntézy APD (PBD, linkomycin či hormaomycin).

gen	velikost kódovaného proteinu v aminokyselinách	nebližší homolog v GenBank (BlastX)	% identity/ podobnosti	Sekvenční analýza genů limazepinového biosyntetického shluku dle BlastX	homolog tomaymycinového biosyntetického shluku (BlastX)	% identity/ podobnosti
lim1	604	ACN39014	51/63	NRPS	TomA (ACN39014)	51/63
lim2	1547	ACN39015	51/62	NRPS	TomB (ACN39015)	51/62
lim3	419	WP_030988779	63/75	3-deoxy-D-arabino-heptulosonát-7-fosfát (DAHP) synthasa	TomC (ACN39016)	62/73
lim4	253	WP_030623023	87/91	2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoát dehydrogenasa		
lim5	226	WP_010847999	53/68	2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoát synthasa (isochorismatasa)		
lim6	658	ACN39017	59/68	phenazin biosyntetický protein PhzE	TomD (ACN39017)	59/68
lim7	193	ACN39018	61/71	Phenol-2-monooxygenasa (reduktázová složka)	TomE (ACN39018)	61/71
lim8	517	WP_030623015	94/97	Phenol-2-monooxygenasa (oxygenázová složka)	TomF (ACN39019)	83/90
lim9	221	WP_030623013	89/95	methyltransferasa	TomG (ACN39020)	62/73
lim10	169	WP_030623011	86/89	L-DOPA-2,3 dioxygenasa	TomH (ACN39021)	65/73
lim11	313	ACN39744	46/58	tyrosin hydroxylasa	TomI (ACN39022)	46/58
lim12	319	ACN39023	67/78	F-420-dependntní reduktasa	TomJ (ACN39023)	67/78
lim13	287	CAA55771	48/60	isomerasa	TomK (ACN39024)	47/55
lim14	596	WP_030623003	88/93	γ-glutamyltransferasa	TomL (ACN39025)	66/76
lim15	763	WP_030623001	90/95	UvrA drug resistance pumpa	TomM (ACN39026)	66/78
lim16	391	WP_031332393	32/51	flavinová monooxygenasa		
lim17	160	WP_030622997	91/94	transkripční regulátor z rodiny MarR		
lim18	480	WP_030622995	85/92	flavin obsahující aminová oxidasa	TomQ (ACN39030)	67/79

	NRPS
	biosyntéza anthranilátové podjednotky
	biosyntéza APD podjednotky
	rezistence/ regulace

Tabulka 7. Sekvenční analýza limazepinového biosyntetického shluku genů.

Pro biosyntézu anthranilátové podjednotky byly doposud popsány dvě nezávislé biosyntetické dráhy, dráha kynureninová, která se uplatňuje v biosyntéze PBD s hydroxylovaným uhlíkem v pozici C9 a dále dráha chorismátová typická pro PBD v této pozici nehydroxylované (Li *et al*, 2009a; Li *et al*, 2009b). *Micrococcus* sp. ICBB 8177 produkuje limazepiny jak hydroxylované v pozici C9, tak i limazepin nehydroxylovaný (Fotso *et al*, 2009). Celkem je v limazepinovém biosyntetickém shluku 9 genů přiřazených na základě výsledků BlastX analýzy k biosyntéze anthranilátové podjednotky (*lim3*, *lim4*, *lim5*, *lim6*, *lim7*, *lim8*, *lim9*, *lim16* a *lim18*). Produkty těchto genů mají své homology mezi enzymy chorismátové dráhy. Gen *lim3* pravděpodobně kóduje DAHP synthasu, což je enzym katalyzující první klíčový a regulační krok šikimátové dráhy (homolog *tomC*). Ostatní enzymy šikimátové dráhy, stejně jako v případě tomaymycinového biosyntetického shluku, nejsou přítomny. Produktem šikimátové dráhy je chorismát, který je v biosyntéze tomaymycinu přeměněn na anthranilát enzymy podobnými anthranilát synthase (TomD, TomP). V limazepinovém biosyntetickém shluku byl identifikován pouze gen *lim6* homologu genu *tomD*.

Genový shluk pro biosyntézu limazepinů dále obsahuje geny přeměny isochorismátu. Gen *lim5* kóduje pravděpodobně dle BlastX 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoát synthasu (isochorismatasa), enzym katalyzující reakci přeměny isochorismátu na 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoát (Young & Gibson, 1969). Dále gen *lim4* kóduje protein homologický s 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoát dehydrogenasou. Tento enzym katalyzuje přeměnu 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoátu na 2,3-dihydroxybenzoát (Sundlov *et al*, 2006; Young & Gibson, 1969).

Dále byla zjištěna pozoruhodná homologie enzymů biosyntézy limazepinů Lim6 a Lim5 s enzymy zapojenými v biosyntéze phenazinů PhzE a PhzD. V biosyntéze phenazinů protein PhzE katalyzuje reakci přeměny chorismátu na kyselinu 2-amino-4-deoxyisochorismovou (ADIC) a PhzD katalyzuje přeměnu ADIC na kyselinu 2,3-dihydro-3-hydroxyanthranilovou (DHHA) (Schneemann *et al*, 2011).

V limazepinovém biosyntetickém shluku byly detekovány geny *lim7* a *lim8* (kódují enzymy homologické reduktasové a oxygenasové složce phenol-2-monooxygenasy), které mají své homology v tomaymycinovém biosyntetickém shluku, *tomE* a *tomF*. Odpovídající proteiny TomE, TomF katalyzují další hydroxylaci anthranilátové podjednotky v biosyntéze tomaymycinu (po kondenzaci je hydroxyl v pozici C8) a obdobnou roli očekáváme taktéž u Lim7 a Lim8 v biosyntéze limazepinů.

Protein kódovaný genem *lim9* je dle BlastX homologický s methyltransferasami (homolog *tomG*). V biosyntéze tomaymycinu TomG katalyzuje metylaci hydroxylové skupiny (po kondenzaci je methoxy skupina v pozici C7).

V limazepinovém biosyntetickém shluku byl identifikován další gen, *lim16*, který kóduje protein dle výsledků BlastX analýzy vysoce homologický s flavinovými monooxygenasami. Monooxygenasy katalyzují reakce přenosu hydroxylové skupiny na substrát (Harayama *et al*, 1992).

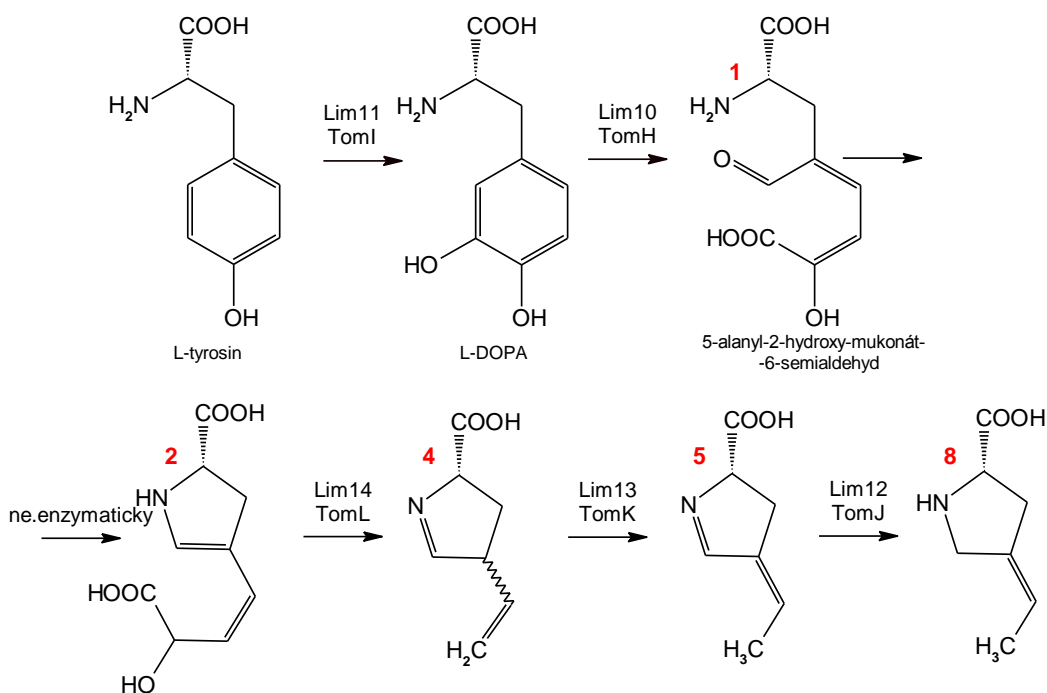
V genovém shluku pro biosyntézu limazepinů byl také identifikován jediný rezistenční gen *lim15* („UvrA-drug resistance pump“, homolog genu *tomM*) a také jeden gen regulační *lim17* (kóduje transkripční regulátor z rodiny MarR). V genomu producenta tomaymycinu byl identifikován homolog genu *lim17*, ale nebyl přiřazen k tomaymycinovému biosyntetickému shluku, nicméně leží v jeho těsné blízkosti (Li *et al*, 2009a). V genovém shluku pro biosyntézu limazepinů leží *lim17* mezi geny jednoznačně přiřazenými k biosyntetickému shluku, proto předpokládáme, že se tento regulační gen bude biosyntézy limazepinů účastnit.

Gen *lim18* je posledním identifikovaným genem limazepinového biosyntetického shluku, jeho homolog z genového shluku pro biosyntézu tomaymycinu je gen *tomQ* a tyto geny kódují pravděpodobně flavinové oxidoredukasy

5.3.3 Návrh dráhy biosyntézy limazepinů

- APD podjednotka

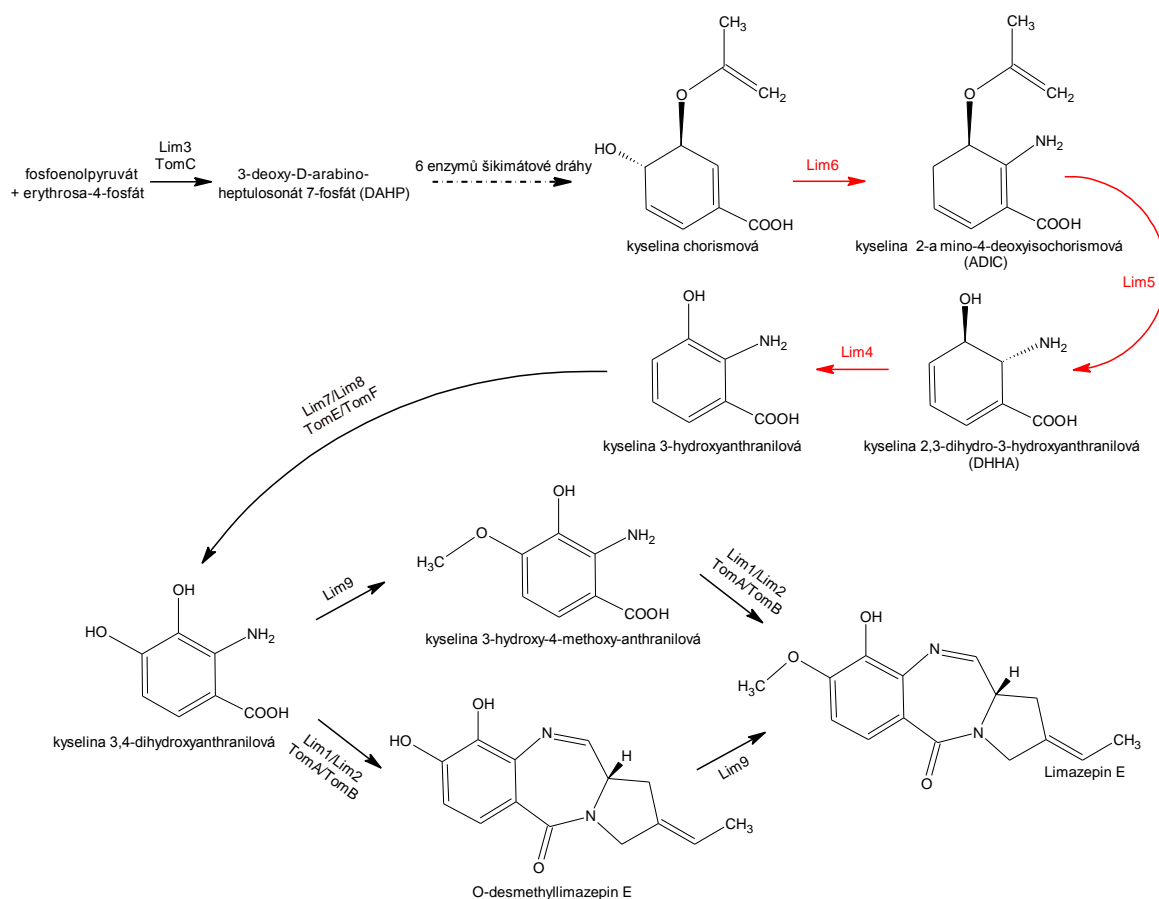
Na základě výsledků analýzy UHPLC-UV-MS již víme, že *Micrococcus* sp. ICBB 8177 produkuje pouze limazepin C nebo E a oxoformu limazepinu C nebo E. Pouze v malém množství je produkován limazepin F. Limazepin C má podle LC-MS analýzy identickou relativní molekulovou hmotnost jako limazepin E, proto nelze jednoznačně určit, o který z těchto dvou izomerů se jedná. Limazepin E je ale pravděpodobnější. Struktura APD podjednotky limazepinu E se totiž zcela shoduje se strukturou APD tomaymycinu a zároveň genové shluky biosyntézy limazepinu a tomaymycinu obsahují stejný soubor genů biosyntézy APD podjednotky. Pro biosyntézu APD podjednotky majoritního produktu limazepinu E a dále limazepinu F bylo navrženo následující schéma (Obrázek 28), které odpovídá nově revidované dráze biosyntézy APD podjednotky (Jirásková 2015, v řízení).



Obrázek 28. Návrh dráhy biosyntézy APD podjednotky limazepinu E a F. Číslování struktur je analogické číslování látek schématu biosyntetické dráhy APD podjednotky v kapitole 2.3.1 Biosyntéza APD podjednotky.

- anthranilátové podjednotka

Pro biosyntézu anthranilátové podjednotky bylo navrženo na základě sekvenční analýzy genů limazepinového biosyntetického shluku následující schéma (Obrázek 29). V biosyntéze anthranilátové podjednotky tomaymycinu katalyzují přeměnu kyseliny chorismové na kyselinu anthranilovou enzymy TomD/TomP. Výsledky analýzy ORF genového shluku pro biosyntézu limazepinů naznačují využití odlišné dráhy, jejíž dva kroky katalyzované enzymy Lim6 (homolog PhzE) a Lim5 (homolog PhzD) jsou pravděpodobně sdíleny s biosyntézou phenazinů (Schneemann *et al*, 2011). Celé navržené schéma odpovídá biosyntéze limazepinu E. Dráha biosyntézy limazepinu F, který je produkován pouze ve stopovém množství, by mohla s největší pravděpodobností využívat anthranilát z primárního metabolismu, který by byl přímo rozpoznáván příslušnou NRPS (Lim1).



Obrázek 29. Schéma biosyntézy anthranilátové podjednotky limazepinů. Červenými šipkami jsou vyznačené reakce, které nebyly popsány v dráze biosyntézy anthranilátové podjednotky tomaymycinu. Není prokázáno, jestli methylace katalyzovaná Lim9 probíhá před, a nebo až po kondenzaci, proto schéma uvádí obě možnosti.

5.4 Sekvence genomu producenta limazepinů (*Micrococcus* sp. ICBB 8177)

Po sekvenaci přístrojem MiSeq systémem Illumina (coverage přibližně 124×) a následném sestavení kratších kontigů do delších úseků (assembling) byla sekvence celého genomu tvořena 28 fragmenty. Velikost genomu kmene *Micrococcus* sp. ICBB 8177 je 6,331,712 bp. Genom byl anotován programem RAST, který určil jako nejpříbuznější mikroorganismus *Streptomyces avermitilis* MA-4680, což je dalším potvrzením správnosti revize taxonomického zařazení (viz kapitola 5.1.2 Ověření taxonomického zařazení producenta limazepinů). Anotovaná sekvence genomu bude uložena v databázi GenBank následně po revizi taxonomické identifikace *Micrococcus* sp. ICBB 8177 autory článku Fotso a kol. (Fotso *et al*, 2009).

5.4.1 Analýza genových shluků pro biosyntézu sekundárních metabolitů v genomu *Micrococcus* sp. ICBB 8177

Celý anotovaný genom byl analyzován programem antiSMASH, nástrojem pro vyhledávání biosyntetických shluků sekundárního metabolismu. Tato analýza byla provedena z důvodu ověření přítomnosti pouze jediného limazepinového biosyntetického shluku. Program antiSMASH detekoval celkem 50 biosyntetických shluků, z toho 6 shluků obsahovalo geny pro NRPS. Genové shluky obsahující NRPS byly dále analyzovány. Pouze jeden identifikovaný biosyntetický shluk obsahoval 2 NRPS, které odpovídaly dle BlastX tomaymycinovým NRPS, TomA a TomB. Tento genový shluk rovněž obsahoval geny biosyntézy APD a anthranilátové podjednotky a odpovídal limazepinovému biosyntetickému shluku, popsanému v kapitole 5.4. Sekvenční analýza limazepinového biosyntetického shluku.

V ostatních genových shlucích nebyly identifikovány geny biosyntézy APD ani anthranilátové podjednotky. Dokonce 2 detekované genové shluky obsahovaly kromě genů pro NRPS také geny PKS (polyketid synthetasy) zcela netypické pro genové shluky biosyntézy PBD. Všechny detekované NRPS byly také prověřeny BlastX analýzou a žádný z těchto genů nebyl podobný genům NRPS z biosyntetických shluků PBD. Na základě výsledků antiSMASH analýzy

byla v genomu *Micrococcus* sp. ICBB 8177 potvrzena přítomnost pouze jediného genového shluku zodpovědného za biosyntézu limazepinů.

6. DISKUZE

6.1 Taxonomické zařazení producenta limazepinů

(*Micrococcus* sp. ICBB 8177)

Tato diplomová práce navazuje na publikaci „Limazepines A-F, Pyrrolo[1,4]benzodiazepine Antibiotics from an Indonesian *Micrococcus* sp.“ (Fotso *et al*, 2009). Je zde popsán bakteriální kmen *Micrococcus* sp. ICBB 8177 jako první producent látek PBD v rámci rodu *Micrococcus*. Většina dosud popsaných mikroorganismů produkujících PBD patří do rodu *Streptomyces* (Gerratana, 2012), výjimkami je látka sibanomicin, produkováná zástupcem rodu *Micromonospora* (Itoh *et al*, 1988) a sibiromycin, který je produkován mikroorganismem rodu *Streptosporangium* (Parker & Babine, 1982).

Modelový kmen *Micrococcus* sp. ICBB 8177 byl získán od autorů výše zmíněné publikace z Oregon State University a je uložen ve sbírce ICBB-CC (Indonesian **C**enter for **B**iodiversity and **B**iot**e**chnology, **C**ulture **C**ollection of Microorganisms).

Morfologické znaky buněk *Micrococcus* sp. ICBB 8177 neodpovídaly původnímu publikovanému taxonomickému zařazení do rodu *Micrococcus*. Pro rod *Micrococcus* jsou typické kulovité buňky (koky), které netvoří spory (Madigan *et al*, 2010). Avšak pozorované charakteristiky buněk obdrženého kmene, jako například sporulace, tvorba vzdušného mycelia či vláknitý růst, odpovídaly spíše rodu *Streptomyces* (Madigan *et al*, 2010).

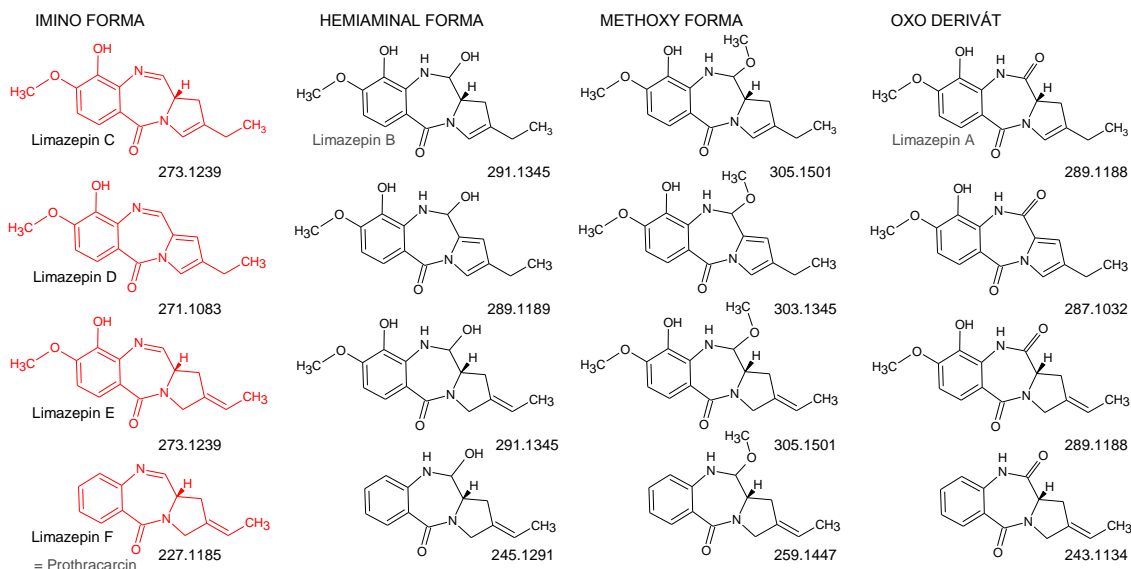
Také výsledky sekvenace PCR produktů 16S rDNA jasně odpovídaly rodům *Streptomyces*, 97% identita se sekvencí 16S rDNA kmene *Streptomyces* sp. 8-39, v druhém případě 98% identita se sekvencí 16S rDNA *Streptomyces* sp. Aac-12. Podle Hagström a kol. je možné pokládat za stejný druh ty bakterie, jejichž shoda v sekvencích 16S rDNA $\geq 97\%$, do stejného rodu lze potom řadit mikroorganismy se shodou v 16S rDNA $\geq 93\%$ (Hagstrom *et al*, 2000).

Taxonomické zařazení do rodu *Streptomyces* potvrzuje taktéž analýza celého genomu.

➔ Autoři zmíněné publikace byli o našich závěrech informováni a přislíbili revizi taxonomické klasifikace.

6.2 Analýza produkce limazepinů (metodou UHPLC-UV-MS)

Podle publikace Fotso a kol. měl být *Micrococcus* sp. ICBB 8177 producentem celkem 7 různých limazepinů (Fotso *et al*, 2009). Vzhledem k publikovaným údajům (Gerratana, 2012) bylo navrženo považovat imino formu PBD za základní látku, ostatní formy vznikají pouze důsledkem podmínek skladování nebo chemické analýzy. Ve skutečnosti tedy *Micrococcus* sp. ICBB 8177 produkuje ne 7 různých látek, ale pouze 4 limazepiny (limazepin C, D, E a F, na obrázku 30 červeně vyznačené látky), limazepin B je hemiaminal formou limazepinu C a limazepin A je oxo derivát taktéž limazepinu C (Obrázek 30). Také prothracarcin byl v této publikaci popsán jako další látka ze skupiny PBD produkovaná kmenem *Micrococcus* sp. ICBB 8177, nicméně struktura prothracarcinu je zcela identická limazepinu F (Obrázek 30).



Obrázek 30. Struktury limazepinů s uvedením relativních molekulových hmotností. Červeně jsou vyznačeny základní imino formy limazepinů, v ostatních sloupcích jsou zobrazeny heminal a methoxy formy a oxo deriváty limazepinů.

Dle UHPLC-UV-MS analýzy byly v produkčním médiu *Micrococcus* sp. ICBB 8177 identifikovány pouze 2 majoritní PBD látky, limazepin C nebo E a oxoderivát limazepinu C nebo E. Na základě LC-MS analýzy nelze určit, o který z těchto dvou limazepinů se ve skutečnosti jedná. Imino forma limazepinu C má totiž stejnou relativní molekulovou hmotnost jako imino forma limazepinu E a oxo derivát limazepinu C má stejnou relativní molekulovou hmotnost jako oxo derivát limazepinu E (limazepiny C se totiž od limazepinů E liší pouze polohou dvojné vazby).

Na základě analýzy limazepinového biosyntetického shluku a porovnání s ostatními PBD předpokládáme spíše produkci limazepinu E. Struktura APD podjednotky limazepinu E je zcela identická s APD podjednotkou tomaymycinu. Také soubor genů biosyntézy APD podjednotky se shoduje v limazepinovém a tomaymycinovém biosyntetickém shluku. Identifikovaný limazepinový biosyntetický shluk nekóduje žádný protein s dosud nepřirazenou funkcí, který by mohl katalyzovat posun dvojné vazby APD podjednotky do pozice C2-C3 odpovídající limazepinu C.

V malém množství byl pomocí UHPLC-UV-MS detekován limazepin F. Vzniká tedy pravděpodobně jen jako vedlejší produkt biosyntézy. Soubor genů limazepinového biosyntetického shluku kóduje proteiny biosyntézy anthranilátové podjednotky, jejímž produktem je pravděpodobně kyselina 3-hydroxyanthranilová, případně její více substituované deriváty. V žádném z biosyntetických kroků ovšem nevzniká kyselina anthranilová, pravděpodobný prekurzor biosyntézy limazepinu F. Nicméně kyselina anthranilová je v bakteriální buňce běžně přítomna jako prekurzor biosyntézy aminokyseliny tryptofanu (Rydon, 1948). Lze tedy předpokládat, že limazepin F bude syntetizován pouze v případě, kdy NRPS Lim1 rozpozná jako svůj substrát kyselinu anthranilovou z primárního metabolismu.

➔ Domníváme se, že studovaný kmen *Micrococcus* sp. ICBB 8177 produkuje místo publikovaných sedmi limazepinů pouze limazepin E a oxoformu limazepinu E a jako minoritní produkt limazepin F.

➔ Toto zjištění je zcela ve shodě s předpokladem přítomnosti pouze jediného genového shluku pro biosyntézu limazepinů, kde se soubor genů biosyntézy APD podjednotky naprosto shoduje s geny tomaymycinového biosyntetického shluku.

➔ Lze připustit, že autoři publikace identifikovali námi nedetekované látky (publikace neobsahuje dostatek primárních dat, aby bylo možné tyto závěry ověřit), ty by ale zřejmě byly také syntetizovány pouze jako minoritní produkty bez vlastní biosyntetické dráhy ale se zapojením některých enzymů kódovaných v chromosomu mimo limazepinový biosyntetický shluk.

Nadále budeme vycházet z předpokladu, že kmen produkuje majoritně limazepin E a oxoformu limazepinu E a v malém množství limazepin F.

6.3 Sekvenční analýza limazepinového biosyntetického shluku

6.3.1 Hranice genového shluku pro biosyntézu limazepinů

Hranice genového shluku pro biosyntézu limazepinů byly predikovány na základě BlastX analýzy okolí předpokládaného biosyntetického shluku. Analýzou BlastX byly prověřeny 4 geny před a 4 geny za předpokládanými hranicemi limazepinového biosyntetického shluku. Gen označený jako *o4*, v těsném sousedství shluku genů pro biosyntézu limazepinů, dle BlastX kóduje protein homologický s proteiny Spo0J, které jsou řazeny do superrodiny proteinů ParBc. Proteiny Spo0J bývají zapojeny nejen v asymetrickém dělení buněk během sporulace ale i při vegetativním buněčném dělení (Ireton *et al*, 1994) u mnoha bakteriálních druhů (Lee *et al*, 2003). Aktivita Spo0J se absolutně neshoduje s biosyntézou PBD. Proto předpokládáme, že ani další analyzované geny (*o3*, *o2*, *o1*) nebudou náležet genovému shluku pro biosyntézu limazepinů. Gen *o3* kóduje pravděpodobně diguanylát cyklastu. Tento enzym katalyzuje reakci biosyntézy signální molekuly C-di-GMP, ani zapojení tohoto enzymu nebylo v biosyntéze limazepinu očekáváno. Tato signální molekula hraje nezastupitelnou roli například v regulaci buněčné diferenciace, virulence, bioluminiscence, adheze a tvorby biofilmů (Whiteley & Lee, 2015). Enzymy kódované geny *o2* (dle BlastX nejpodobnější desaturase mastných kyselin) a *o1* (podle analýzy BlastX homologický s 3-oxoacyl-ACP synthasou, což je enzym, který obvykle katalyzuje elongační kroky biosyntézy mastných kyselin) budou pravděpodobně zapojeny v biosyntéze mastných kyselin.

V těsném sousedství genu *lim18* leží gen *o5*, který kóduje protein dle BlastX vykazující nejvyšší stupeň homologie s membránovými přenašeči (kation/proton transportér) typu KefB, které zprostředkovávají antiport K^+/H^+ . Aktivita tohoto enzymu také přímo nesouvisí s biosyntézou sekundárních metabolitů, proto se domníváme, že ani další prověřované geny již do limazepinového biosyntetického shluku patřit nebudou. Dalším genem je *o6*, který na základě analýzy BlastX kóduje pravděpodobně protein cytochrom P450. Cytochromy P450 jsou hemoproteiny zejména s monooxygenasovou aktivitou. Bakteriální cytochromy P450 hrají roli v katalýze celé řady reakcí jako je například biotransformace xenobiotik (Taylor *et al*, 1999), metabolismus mastných kyselin (Lawson *et al*, 2004), nebo biosyntéza některých sekundárních metabolitů (Fjaervik & Zotchev, 2005; Mendes *et al*, 2005; Moody *et al*, 2012; Napan *et al*, 2012). V genovém shluku pro biosyntézu anthramycinu a porothramycinu byly identifikovány geny pro cytochrom P450 hydroxylasu (Hu *et al*, 2007; Najmanova *et al*, 2014), proto by i gen *o6* mohl být hypoteticky součástí limazepinového genového shluku, ale vzhledem k predikované aktivitě genu *o5* navrhuji gen *o6* neřadit do limazepinového biosyntetického shluku. Toto tvrzení podporuje také navržené schéma biosyntézy limazepinů (limazepinů E a F), které nepostrádá žádnou další aktivitu enzymů z rodiny monooxygenas. Nelze vyloučit, že gen *o6* bude již součástí jiného biosyntetického shluku v těsné blízkosti genového shluku pro biosyntézu limazepinů. Následuje gen *o7* kódující protein dle BlastX homologický s oxidasami 2-hydroxykyselin a gen *o8* vykazující vysoký stupeň homologie s pyridin nukleotid-disulfid oxidoreduktasami. Ani jeden z těchto genů nebyl identifikován v žádném PBD biosyntetickém shluku. Geny *o5*–*o8* jsou také kódovány v opačné orientaci oproti genu *lim18*, jasně přiřazenému k limazepinovému biosyntetickému shluku, což také podporuje správnost navržených hranic genového shluku pro biosyntézu limazepinů.

➔ Limazepinový biosyntetický shluk o délce 25568 bp s největší pravděpodobností zahrnuje 18 genů (*lim1* – *lim18*) a je ohraničen geny *o4* a *o5*, které leží již mimo genový shluk pro biosyntézu limazepinů.

6.3.2 Analýza genů limazepinového biosyntetického shluku

Jednotlivé ORF genového shluku pro biosyntézu limazepinů byly analyzovány pomocí BlastX. Nejpodobnějším genovým shlukem pro biosyntézu jiného PBD je tomaymycinový biosyntetický shluk (Li *et al.*, 2009a), proto i následující text porovnává zejména tyto 2 biosyntetické genové shluky.

6.3.2.1 Kondenzační reakce, NRPS geny *lim1* a *lim2*

V genovém shluku pro biosyntézu limazepinů jsou přítomny geny *lim1* (homolog *tomA*) a *lim2* (homolog *tomB*). A-doména NRPS Lim1 je zodpovědná za rozpoznání a aktivaci anthranilátové podjednotky a A-doména Lim2 rozpoznává a aktivuje APD podjednotku limazepinů, aktivované prekursor jsou následně kondenzovány za vzniku tricyklické molekuly limazepinů.

Na základě porovnání neribosomálních kódů (Tabulka 8) NRPS lze usuzovat, v jaké formě vstupují jednotlivé prekursor do kondenzační reakce a jaké reakce upravující ornamentaci molekuly následují až po kondenzační reakci na tricyklické molekule PBD.

- Substrátová specifita A-domén rozpoznávajících APD podjednotku

Podoba rozpoznávané APD podjednotky se v rámci PBD látek podstatně liší. Lim2 a TomB rozpoznávají APD s dvouuhlíkatým postranním řetězcem, Por21, ORF 22 a SibD APD podjednotku s tříuhlíkatým postranním řetězcem a tilivallinová NpsB rozpoznává pravděpodobně pouze L-prolin.

A

NRPS rozpoznávající anthranilátovou podjednotku											
NRPS	neribosomální kód										
	2	2	2	2	2	3	3	3	3	5	
	3	3	3	7	9	0	2	3	3	1	
	5	6	9	8	9	1	2	0	1	7	
Lim1	A	A	N	S	F	S	G	A	I	K	
TomA	A	A	I	S	L	S	G	S	I	K	
POR20	A	A	T	H	L	S	A	T	L	K	
ORF21	A	A	T	N	I	S	A	A	L	K	
SibE	A	A	T	N	I	S	A	A	L	K	
NpsA	A	A	N	F	V	S	G	A	I	K	

B

NRPS rozpoznávající APD podjednotku											
NRPS	neribosomální kód										
	2	2	2	2	2	3	3	3	3	5	
	3	3	3	7	9	0	2	3	3	1	
	5	6	9	8	9	1	2	0	1	7	
Lim2	D	V	M	Y	A	V	M	L	A	K	
TomB	D	V	M	Y	T	V	M	L	A	K	
Por21	D	V	L	Y	Y	T	A	L	C	K	
ORF22	D	V	L	Y	Y	T	A	L	V	K	
SibD	D	V	M	F	Y	T	A	L	V	K	
NpsB	D	V	Q	Y	Y	T	L	V	C	K	

Tabulka 8. Neribosomální kódy A-domén NRPS rozpoznávajících anthranilátovou (A) a APD podjednotku či prolin (B) v biosyntéze PBD. Pozice aminokyselin jsou stanoveny podle Conti *et al.*, 1997. Červeně jsou zvýrazněny pozice aminokyselin neribosomálních kódů, které jsou shodné s neribosomálním kódem limazepinových A-domén NRPS. Lim=limazepinová, Tom=tomaymycinová, POR=porothramycinová, ORF: anthramycinová, Sib: sibiromycinová a Nps: tilivallinová NRPS. Neribosomální kódy byly stanoveny programem NRPS predictor2.

APD podjednotka v molekule tomaymycinu a limazepinů je zcela identická (reálně identifikované limazepiny E a F), také neribosomální kódy A-domén Lim2/TomB se liší pouze záměnou jedné aminokyseliny, což nasvědčuje pravděpodobně rozpoznávání totožných substrátů příslušnými A-domény. Podobnost neribosomálních kódů odpovídá v obou případech rozpoznávání APD podjednotky s dvouuhlíkatým postranním řetězcem a předpokládáme, že APD podjednotky budou rozpoznávány ve formě látky 8 na obrázku 28 (na straně 76). Domníváme se, že obecně u PBD inkorporujících APD, bude tato podjednotka rozpoznávána právě v této fázi biosyntézy (a v analogické podobě u PBD s tříuhlíkatým postranním řetězcem) a ostatní modifikace postranního řetězce budou pravděpodobně následovat až po kondenzační reakci (nepublikovaná data).

- Substrátová specifita A-domén rozpoznávajících anthranilátovou podjednotku

Neribosomální kód A-domény NRPS rozpoznávající anthranilátovou podjednotku je nejpodobnější neribosomálnímu kódu tilivallinové (NpsA) a tomaymycinové NRPS (TomA). Podobnost s tilivallinovým neribosomálním kódem by mohla odpovídat rozpoznávání již hydroxylované anthranilátové podjednotky (po kodenziaci bude tento hydroxyl v pozici C9) prostřednictvím limazepinové A-domény NRPS Lim1. Tomaymycinový anthranilátový kruh je C8 hydroxylovaný a hydroxylová skupina na C7 je methylovaná. Anthranilátový kruh limazepinu E je C9 hydroxylovaný a hydroxylová skupina na C8 je methylovaná. Limazepin E i tomaymycin mají tedy anthranilátový kruh substituovaný stejnými funkčními skupinami, pouze v odlišných pozicích. Jistá podobnost neribosomálního kódu Lim1 a TomA by mohla poukazovat na možnost rozpoznávání anthranilátové podjednotky již plně substituované jak v případě biosyntézy limazepinů, tak i tomaymycinu. Substrátová specifita byla testována pouze u anthramycinové NRPS ORF21 a sibiromycinové SibE a jako rozpoznávaný substrát byla stanovena kyselina 4-methyl-3-hydroxyanthranilová (Giessen *et al*, 2011; Phelan *et al*, 2009), tedy plně substituovaná anthranilátová podjednotka, pro ostatní NRPS je podoba rozpoznávaných substrátů pouze predikována na základě porovnávání neribosomálních kódů.

Anthranilátová podjednotka limazepinu F se liší od limazepinu E úplnou absencí substituentů, proto se předpokládá nižší specifita A-domény NRPS Lim1,

kteřá by byla schopna rozpoznávat plně nesubstituovanou anthranilátovou podjednotku, kyselinu anthranilovou z primárního metabolismu. Rozšířená specifita NRPS rozpoznávající anthranilátovou podjednotku byla již pozorována v případě SibE, zapojené v biosyntéze PBD sibiromycinu, která je schopna rozpoznat a aktivovat jak přirozený substrát, tak i kyselinu 4-methylantranilovou, čehož bylo využito při biosyntéze 9-deoxysibiromycinu (Yonemoto *et al*, 2012).

➔ V biosyntéze limazepinů bude pravděpodobně do kondenzační reakce vstupovat APD podjednotka odpovídající látce 8 na obrázku 28 (na straně 76)

➔ Anthranilátová podjednotka bude s největší pravděpodobností do kondenzační reakce vstupovat plně substituovaná.

6.3.2.2 Biosyntéza APD podjednotky (*lim10*, *lim11*, *lim12*, *lim13*, *lim14*)

Soubor genů biosyntézy APD podjednotky limazepinů odpovídá zcela zastoupení genů biosyntézy APD podjednotky tomaymycinu (*lim10/tomH*, *lim11/tomI*, *lim12/tomJ*, *lim13/tomK* a *lim14/tomL*). Dráha biosyntézy limazepinové (limazepin E a F) a tomaymycinové APD podjednotky bude tedy pravděpodobně shodná. V obou případech chybí homolog genu pro methyltransferasu, která se účastní biosyntézy všech popsanych APD s tříuhlíkatým postranním řetězcem. Chybějící gen pro methyltransferasu u limazepinů a tomaymycinu odpovídá dvouuhlíkatému postrannímu řetězci APD podjednotky.

Zajímavým aspektem je také rozmístění genů biosyntézy APD podjednotky všech již sekvenovaných PBD shluků. Pouze v limazepinovém a tomaymycinovém biosyntetickém shluku jsou základní geny biosyntézy APD podjednotky lokalizovány pohromadě v jednom podshluku (geny *lim11 – lim14*, *tomH - tomL*). U ostatních PBD biosyntetických shluků jsou mezi základními geny biosyntézy APD vmezeřeny rezistenční či regulační geny nebo také geny kódující enzymy, které se účastní dalších modifikací APD podjednotky. Je možné předpokládat, že se v evoluci PBD shluků šířily geny biosyntézy APD podjednotky nejprve jako celek (podshluk) a posléze se mezi tyto geny začaly vmezeřovat další geny za vzniku komplexnějších PBD shluků.

- **gen *tomN*, jehož homolog nebyl v limazepinovém biosyntetickém shluku identifikován**

Mezi geny biosyntézy APD podjednotky je v případě tomaymycinu řazen také gen *tomN*, který kóduje pravděpodobně enzym tautomerasu („4-oxalocrotonate tautomerase“). Aktivita proteinu TomN nebyla testována, ani nebylo analyzováno produkční médium po inaktivaci genu *tomN*. V genovém shluku pro biosyntézu limazepinů nebyl homolog genu *tomN* detekován. Homologní gen nebyl identifikován ani v dalších již sekvenovaných biosyntetických shlucích PBD, ani v genovém shluku pro biosyntézu linkomycinu a hormaomycinu. Navržené schéma APD podjednotky limazepinů (a tomaymycinu), vycházející z publikace Jirásková a kol. (Jirásková 2015, v řízení), nepostrádá aktivitu žádného enzymu a tudíž aktivita proteinu TomN zůstává nevyřešena.

➔ Dráha biosyntézy APD podjednotky limazepinů je pravděpodobně totožná s biosyntézou APD podjednotky tomaymycinu a odpovídá navrženému schématu na straně 76.

➔ Navržené schéma biosyntézy APD limazepinů předpokládá pouze jeden typ APD podjednotky (odpovídající limazepinu E a F), shodný s APD podjednotkou tomaymycinu.

6.3.2.3 Biosyntéza anthranilátové podjednotky limazepinů (*lim3*, *lim4*, *lim5*, *lim6*, *lim7*, *lim8*, *lim9*)

Doposud byly pro biosyntézu anthranilátové podjednotky PBD navrženy 2 dráhy, kynureninová dráha pro biosyntézu kyseliny 3-hydroxyanthranilové, která je prekurzorem PBD s hydroxylovaným uhlíkem v pozici 9 a dále dráha chorismátová pro biosyntézu kyseliny anthranilové, která je prekurzorem pro PBD v pozici C9 nehydroxylované (Li *et al*, 2009a; Li *et al*, 2009b). Limazepin E má uhlík v pozici 9 hydroxylovaný, minoritně zastoupený limazepin F je v této pozici nehydroxylovaný. Přítomnost hydroxylu na C9 dle publikovaných informací indikuje zapojení kynureninové dráhy, ovšem geny limazepinového biosyntetického shluku přiřazené k biosyntéze anthranilátové podjednotky (*lim3*, *lim4*, *lim5*, *lim6*, *lim7*, *lim8*, *lim9*, *lim16* a *lim18*) odpovídají dráze chorismátové. Nicméně dráha biosyntézy anthranilátové podjednotky limazepinů se

pravděpodobně liší od chorismátové dráhy, uplatňující se v biosyntéze tomaymycinu.

Navržená chorismátová dráha vysvětluje biosyntézu limazepinu E, protože produktem této dráhy je kyselina 3-hydroxyanthranilová (případně její více substituované deriváty). Jak již bylo diskutováno, limazepin F vzniká pouze v malém množství pravděpodobně v případě, kdy NRPS rozpozná místo obvyklého substrátu kyselinu anthranilovou z primárního metabolismu. Limazepinový biosyntetický shluk totiž neobsahuje geny, jejichž produkty by umožnily biosyntézu kyseliny anthranilové. Kyselina anthranilová je v bakteriální buňce běžně prekurzorem biosyntézy aminokyseliny tryptofanu (Rydon, 1948).

- ***lim3***

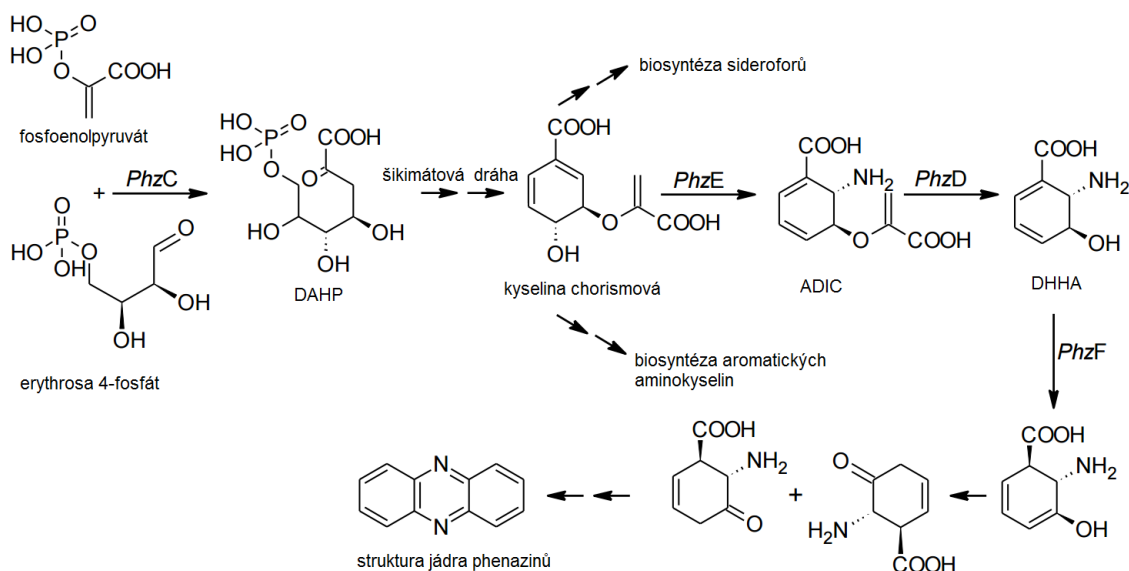
Chorismátová dráha biosyntézy anthranilátové podjednotky využívá šikimátovou dráhu, v primárním metabolismu určenou k biosyntéze aromatických aminokyselin tyrosinu, tryptofanu a fenylalaninu. U mikroorganismů je šikimátová dráha regulována na úrovni prvního enzymu dráhy, DAHP synthasy (Herrmann & Weaver, 1999). Není proto překvapivé, že limazepinový i tomaymycinový biosyntetický shluk obsahují extra kopii genu pro DAHP synthasu (*lim3/tomC*) pro produkci většího množství chorismátu obejitím regulace primárně metabolického enzymu. Jelikož další enzymy šikimátové dráhy nejsou kódovány ani tomaymycinovým ani limazepinovým biosyntetickým shlukem, předpokládá se zapojení enzymů z primárního metabolismu (Li *et al*, 2009a). Jak již bylo uvedeno v kapitole 2.3.2.2 Chorismátová dráha, tato situace není zcela ojedinělá. Se stejným uspořádáním se setkáváme také v biosyntéze látky phenazinu u *Pseudomonas fluorescens*, kde je rovněž zapojena šikimátová dráha a biosyntetický shluk kóduje také pouze DAHP synthasu a ostatní kroky šikimátové dráhy katalyzují enzymy z primárního metabolismu (McDonald *et al*, 2001).

- **lim6**

Produktem šikimátové dráhy je chorismát. V biosyntéze tomaymycinu je chorismát přeměněn na kyselinu anthranilovou enzymy homologickými dle BlastX s anthranilát synthasou (AS), TomD a TomP (Li *et al*, 2009a).

AS jsou heterotetramery, složené z TrpG a TrpE domén (2×TrpG, 2×TrpE). TrpG patří do rodiny glutamin amidotransferas (Zalkin & Smith, 1998). Prostřednictvím TrpG je hydrolyzován glutamin a vznikající NH₃ skupina je přenesena k aktivnímu místu enzymu TrpE, který má dvě katalytické aktivity (Morollo & Bauerle, 1993) a ve dvou krocích přeměňuje kyselinu chorismovou na kyselinu anthranilovou. Nejprve reakcí chorismátu s NH₃ skupinou vzniká 2-amino 2-deoxyisochorismát (ADIC), následně je z molekuly ADIC eliminován pyruvát za vzniku kyseliny anthranilové (Knochel *et al*, 1999).

V limazepinovém biosyntetickém shluku je přítomen pouze jeden gen homologický s geny pro AS, *lim6*. Na rozdíl od genového shluku pro biosyntézu tomaymycinu, limazepinový biosyntetický shluk obsahuje další geny přeměny chorismátu (*lim5*, *lim4*). Na základě výsledků sekvenční analýzy byla zjištěna homologie genů biosyntézy limazepinů s geny biosyntézy phenazinů *lim6/phzE*, *lim5/phzD*. Geny *phzE/phzD* kódují enzymy přeměny chorismátu přes ADIC až na DHHA (dráha biosyntézy phenazinů na obrázku 31).



Obrázek 31. Dráha biosyntézy phenazinů. Protein PhzC je homologický s Lim3, PhzE je homologický s Lim6 a protein PhzD vykazuje vysoký stupeň homologie s Lim5 (Převzato Schneemann *et al.*, 2011).

Na základě sekvenční analýzy limazepinového biosyntetického shluku předpokládáme, že část biosyntetické dráhy limazepinů bude sdílena s biosyntézou phenazinů. Protein PhzE je homodimer blízce příbuzný enzymům AS. Monomer PhzE je tvořen glutamin amidotransferasovou doménou, která je kovalentně vázána k doméně přeměny chorismátu. PhzE se od AS liší zejména neschopností eliminovat pyruvát z ADIC. Protein PhzE tedy není schopen přeměny chorismátu až na kyselinu anthranilovou. Důvod není zcela objasněn, protože aktivní místo domény přeměny chorismátu PhzE je velice podobné aktivnímu místu TrpE u AS (Blankenfeldt & Parsons, 2014).

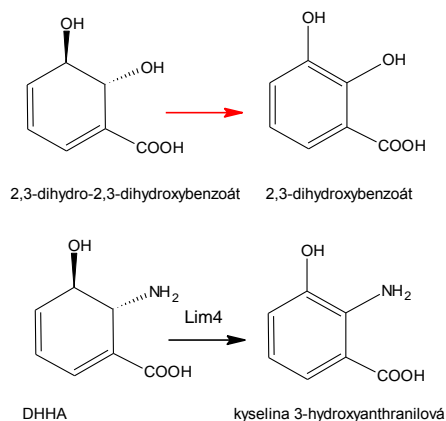
Vzhledem k vysokému stupni homologie AS a PhzE proteinů nelze jednoznačně posoudit, jestli TomD a TomP jsou funkčně spíše AS nebo PhzE. Je velice pravděpodobné, že v biosyntéze tomaymycinu je přeměna chorismátu na anthranilát katalyzována skutečně AS. Nutno podotknout, že aktivita TomD ani TomP nebyla funkčně testována a funkce těchto proteinů byly navrženy pouze na základě sekvenční analýzy (Li *et al*, 2009a).

V případě biosyntézy anthranilátové podjednotky limazepinů předpokládáme funkci Lim6 totožnou spíše s proteiny biosyntézy phenazinů, PhzE. V limazepinovém biosyntetickém shluku jsou totiž kódovány další enzymy přeměny ADIC (Lim5, Lim4).

- ***lim5, lim4***

Protein Lim5 vykazuje vysoký stupeň homologie s proteiny PhzD zapojenými v biosyntéze phenazinů. Tento enzym katalyzuje reakci přeměny ADIC na kyselinu 2,3-dihydro-3-hydroxyanthranilovou (DHHA) (Blankenfeldt & Parsons, 2014; Schneemann *et al*, 2011).

Gen *lim4* kóduje protein dle BlastX podobný 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoát dehydrogenase. Tento enzym se standardně uplatňuje při přeměně 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoátu na 2,3-dihydroxybenzoát (Obrázek 26) například v biosyntéze některých sideroforů (Sundlov *et al*, 2006; Young & Gibson, 1969). Předpokládáme, že tento enzym bude v biosyntéze anthranilátové podjednotky limazepinů katalyzovat reakci přeměny DHHA na kyselinu 3-hydroxyanthranilovou (Obrázek 32).



Obrázek 32. Porovnání reakce přeměny 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoátu na 2,3-dihydroxybenzoát katalyzované 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoát dehydrogenasou (reakce označená červenou šipkou) s navrhovanou funkcí Lim4.

Stejná dráha biosyntézy kyseliny 3-hydroxyanthranilové, jako byla navržena zde pro limazepiny, je pravděpodobně zapojena v biosyntéze anthranilátové podjednotky PBD tilivallinu. Také v tilivallinovém biosyntetickém shluku byl identifikován gen biosyntézy ADIC a dále také 2 další geny které kódují pravděpodobně přeměnu ADIC na kyselinu 3-hydroxyanthranilovou (Schneditz *et al*, 2014), nicméně dráha biosyntézy tilivallinu nebyla zatím studována.

- ***lim7*, *lim8***

V limazepinovém biosyntetickém shluku byly dále identifikovány geny *lim7* a *lim8* (kódující dle BlastX reduktasovou a oxygenasovou složku phenol-2-monooxygenasy), které mají své homology v tomaymycinovém biosyntetickém shluku, *tomE* a *tomF*. Odpovídající proteiny TomE, TomF katalyzují pravděpodobně reakci, při které je přenesena hydroxylová supina na uhlík, který bude po kondenzační reakci v pozici C8. Tato reakce probíhá pravděpodobně před samotnou kondenzací (Li *et al*, 2009a). Vzhledem k přítomnosti hydroxylu ve struktuře limazepinu E ve stejné pozici na C8, je očekávána také identická aktivita enzymů Lim7/Lim8.

Jelikož nebyly identifikovány limazepiny s C8 methoxy skupinou bez C9 hydroxylace, je pravděpodobné, že aktivita enzymů Lim7/Lim8 bude závislá na přítomnosti hydroxylu v pozici C9.

- ***lim9***

Gen *lim9* kóduje protein dle BlastX vysoce homologický s methyltransferasami (homolog *tomG*). V biosyntéze tomaymycinu TomG katalyzuje methylaci hydroxylové skupiny (na již kondenzované molekule tomaymycinu je methylovaná OH skupina v pozici C7). Není ale potvrzeno, jestli v biosyntéze tomaymycinu methylace probíhá před kondenzací nebo na již kondenzované tricyklické molekule. V biosyntéze limazepinů očekáváme aktivitu methyltransferasy Lim9 v odlišné pozici oproti TomG pravděpodobně z důvodu posunuté reakční specifity enzymu. Enzym Lim9 bude pravděpodobně methylovat hydroxylovou skupinu, která je lokalizována na již kondenzované molekule v pozici C8. Ani zde nevíme, jestli tato reakce probíhá na samotné anthranilátové podjednotce nebo následně po kondenzační reakci.

6.3.2.4 Ostatní geny *lim15*, *lim16*, *lim17*, *lim18*

- ***lim15***

V limazepinovém biosyntetickém shluku byl také identifikován jeden rezistenční gen, *lim15*. Tento gen má své homology také v biosyntetických shlucích anthramycinu (*orf8*), sibiromycinu (*sibF*) a tomaymycinu (*tomM*), což může poukazovat na společný mechanismus rezistence. Na základě BlastP analýzy se v proteinu Lim15 vyskytuje specifická doména vysoce homologická s proteinem UvrA, který je součástí DNA opravného excizního systému UvrABC (Van Houten *et al*, 2005), což by mohlo souviset s mechanismem působení látek PBD. Takový mechanismus rezistence by mohl být zodpovědný za odstraňování PBD látek z chromosomu produkčního mikroorganismu. Diskutované enzymy ORF8, SibF, TomM a Lim15 jsou vysoce homologní s rezistenčním proteinem DrrC z genového shluku biosyntézy taktéž protinádorové látky daunorubicinu. I v tomto případě se uvažuje role DrrC v zabránění či destabilizaci vazby daunorubicinu k DNA (Lomovskaya *et al*, 1996). Tyto proteiny proteiny Lim15/ORF8/SibF/TomM a DrrC vykazují rovněž sekvenční homologii s ABC transportéry, proto také nelze vyloučit mechanismus rezistence exportem látek z bakteriální buňky.

- ***lim16***

Gen *lim16* kóduje protein dle BlastX homologický s flavinovými monooxygenasami. Monooxygenasy jsou enzymy, které obvykle katalyzují přenos jedné hydroxylové skupiny na substrát (Harayama *et al*, 1992). Zapojení enzymu Lim16 je nejasné, protože v biosyntéze limazepinů E a F nepostrádáme aktivitu žádného enzymu z rodiny monooxygenas. V navržené dráze biosyntézy limazepinů nepostrádáme aktivitu žádného enzymu, proto je namístě zvážit, zda jsou hranice genového shluku pro biosyntézu limazepinů stanoveny správně. Ale vzhledem k tomu, že homolog genu *lim18* je součástí dalších tří PBD biosyntetických shluků, ponecháváme také tento gen přiřazený k limazepinovému biosyntetickému shluku.

- ***lim17***

V genovém shluku pro biosyntézu limazepinů byl dále popsán gen, jehož homolog byl identifikován v těsném sousedství tomaymycinového biosyntetického shluku, ale nebyl k tomuto shluku přiřazen. Gen *lim17* kóduje dle BlastX protein homologický s transkripčními regulátory z rodiny MarR. Inaktivace genu pro MarR transkripční regulátor u producenta tomaymycinu neměla vliv na produkci této látky (Li *et al*, 2009a), proto nelze jednoznačně predikovat funkci Lim17 v biosyntéze limazepinů. I přesto byl tento gen přiřazen k limazepinovému biosyntetickému shluku, protože je lokalizován uvnitř shluku mezi geny, které byly k biosyntéze limazepinů jednoznačně přiřazeny.

- ***lim18***

Posledním genem limazepinového biosyntetického shluku je gen *lim18*, homolog *tomQ/orf24/por5*. Tyto geny kódují dle BlastX protein vykazující vysoký stupeň homologie s flavinovými oxidoreduktasami. Role proteinu TomQ v biosyntéze tomaymycinu není zatím dořešena, protože inaktivace genu *tomQ* nenarušuje biosyntézu tomaymycinu (Li *et al*, 2009a), na druhou stranu inaktivace homologního genu biosyntézy anthramycinu *orf24* inhibuje biosyntézu této látky (Hu *et al*, 2007). Proteiny ORF24 i TomQ byly přiřazeny k biosyntéze anthranilátové podjednotky, ale jejich přesná funkce nebyla vyřešena. Proto ani zapojení Lim18 v biosyntéze limazepinů nelze na základě srovnání s jeho homology predikovat.

Jednou z možných funkcí oxidoreduktas Lim18/TomQ/ORF24/POR5 by mohla být přeměna limazepinů, tomaymycinu, anthramycinu a porothramycinu na jejich biologicky neaktivní oxoformu, což je pravděpodobně jeden z mechanismů vzniku rezistence k PBD (Gerratana, 2012). Byl by možný takový regulační mechanismus, který by při inaktivaci důležitého rezistenčního genu pozastavil biosyntézu dané látky, aby nedošlo k poškození produkčního mikroorganismu. Tím by se vysvětlila inhibice biosyntézy anthramycinu po inaktivaci hypotetického rezistenčního genu *orf24*. Inaktivace rezistenčního genu *tomQ* nepozastavuje biosyntézu tomaymycinu možná z důvodu přítomnosti dalšího významnějšího rezistenčního mechanismu.

➔ Nově navržené schéma představuje zatím nepopsanou dráhu biosyntézy anthranilátové podjednotky PBD s hydroxylovaným uhlíkem v pozici 9 s využitím chorismátové dráhy. Podobná dráha biosyntézy anthranilátové podjednotky bude zapojena pravděpodobně také v biosyntéze tilivallinu.

➔ Biosyntéza anthranilátové podjednotky PBD hydroxylovaných v pozici C9 může tedy využívat nejen kynureninovou dráhu, jak bylo doposud předpokládáno, ale i dráhu chorismátovou.

➔ Navržené schéma vysvětluje biosyntézu všech detekovaných limazepinů.

➔ Existuje pravděpodobně evoluční propojení biosyntézy PBD, linkosamidů a hormaomycinu. Biosyntetické shluky těchto látek sdílí soubor genů biosyntézy APD podjednotky. Dále předpokládáme jisté evoluční propojení biosyntézy PBD a linkosamidů s phenaziny. Genové shluky biosyntézy těchto látek sdílí gen pro isomerasu, která se u linkosamidů a PBD účastní biosyntézy APD podjednotky. Dále genové shluky biosyntézy PBD a phenazinů sdílí některé geny chorismátové dráhy.

7. SOUHRN

→ Studovaný kmen *Micrococcus* sp. ICBB 8177 měl být dle publikace zodpovědný za produkci 7 různých limazepinů (limazepiny A, B1, B2, C, D, E a F). Dvě z těchto sedmi látek (limazepin B a A) jsou již na základě publikovaných dat jen odlišnými formami limazepinu C. Podle výsledků UHPLC-UV-MS tento kmen produkuje pravděpodobně pouze limazepin E a v malém množství limazepiny F.

→ Pozorované morfologické znaky kmene *Micrococcus* sp. ICBB 8177 neodpovídaly rodu *Micrococcus*, ale spíše rodu *Streptomyces* (sporulace, vláknitý růst, tvorba vzdušného mycelia), taktéž sekvenace 16S rDNA potvrdila nové zařazení producenta limazepinu do rodu *Streptomyces*.

→ Byla připravena kosmidová genomová knihovna (z chDNA kmene *Micrococcus* sp. ICBB 8177). V kosmidové knihovně byl identifikován shluk genů pro biosyntézu limazepinů, který byl sekvenován a charakterizován

→ Na základě BlastX analýzy byly predikovány funkce jednotlivých proteinů kódovaných limazepinovým biosyntetickým shlukem. Podle výsledků této analýzy bylo navrženo schéma biosyntézy APD a anthranilátové podjednotky limazepinů.

→ Soubor genů biosyntézy APD podjednotky je sdílen limazepinovým a již dříve popsaným tomaymycinovým biosyntetickým shlukem, proto bude pravděpodobně dráha biosyntézy APD podjednotky těchto látek shodná.

→ Limazepin E je hydroxylovaný v pozici C9, limazepin F je v této pozici nehydroxylovaný. Doposud byl hydroxyl v pozici C9 známkou zapojení kynureninové dráhy v biosyntéze anthranilátové podjednotky PBD. V této diplomové práci je popsána dráha biosyntézy PBD hydroxylovaných v pozici C9 s využitím dráhy chorismátové.

→ Genom kmene *Micrococcus* sp. ICBB 8177 byl sekvenován a anotován. Sekvence genomu byla dále analyzována pro potvrzení přítomnosti pouze jediného genového shluku zodpovědného za biosyntézu limazepinů.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O (2008) The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* **9**: 75

Baltz RH, Nguyen KT, Alexander DC (2010) Reprogramming daptomycin and A54145 biosynthesis to produce novel lipopeptide antibiotics. *Enzyme Technologies: Metagenomics, Evolution, Biocatalysis, and Biosynthesis* **1**: 285-308

Bentley R (1990) The shikimate pathway--a metabolic tree with many branches. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **25**(5): 307-384

Blankenfeldt W, Parsons JF (2014) The structural biology of phenazine biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol* **29**: 26-33

Blin K, Medema MH, Kazempour D, Fischbach MA, Breitling R, Takano E, Weber T (2013) antiSMASH 2.0--a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers. *Nucleic Acids Res* **41**:204-212

Brahme NM, Gonzalez JE, Rolls JP, Hessler EJ, Mizersak S, Hurley LH (1984) Biosynthesis of the lincomycins. 1. Studies using stable isotopes on the biosynthesis of the propyl- and ethyl-L-hygric acid moieties of lincomycins A and B. *Journal of the American Chemical Society* **106**(25): 7873-7878

Brettin T, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Olsen GJ, Olson R, Overbeek R, Parrello B, Pusch GD, Shukla M, Thomason JA, 3rd, Stevens R, Vonstein V, Wattam AR, Xia F (2015) RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci Rep* **5**: 8365

Chen Z, Gregson SJ, Howard PW, Thurston DE (2004) A novel approach to the synthesis of cytotoxic C2-C3 unsaturated pyrrolo[2,1-c]benzodiazepines (PBDs) with conjugated acrylyl C2-substituents. In *Bioorg Med Chem Lett*, **14**: 1547-1549

Clarke L, Carbon J (1976) A colony bank containing synthetic Col EI hybrid plasmids representative of the entire E. coli genome. *Cell* **9**(1): 91-99

Clingen PH, De Silva IU, McHugh PJ, Ghadessy FJ, Tilby MJ, Thurston DE, Hartley JA (2005) The XPF-ERCC1 endonuclease and homologous recombination contribute to the repair of minor groove DNA interstrand crosslinks in mammalian cells produced by the pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine dimer SJG-136. In *Nucleic Acids Res.* **33**: 3283-3291

Colabroy KL, Hackett WT, Markham AJ, Rosenberg J, Cohen DE, Jacobson A (2008) Biochemical characterization of L-DOPA 2,3-dioxygenase, a single-domain type I extradiol dioxygenase from lincomycin biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* **479**(2): 131-138

Connor KL, Colabroy KL, Gerratana B (2011) A heme peroxidase with a functional role as an L-tyrosine hydroxylase in the biosynthesis of anthramycin. *Biochemistry* **50**(41): 8926-3826

Conti E, Stachelhaus T, Marahiel MA, Brick P (1997) Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *Embo j* **16**(14): 4174-4183

Finking R, Marahiel MA (2004) Biosynthesis of nonribosomal peptides1. *Annu Rev Microbiol* **58**: 453-488

Fjaervik E, Zotchev SB (2005) Biosynthesis of the polyene macrolide antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei*. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**(4): 436-443

Fotso S (2010) Naturally Occuring Pyrrolo[1,4]benzodiazepines in Bacteria. *Mini-Reviews in Organic Chemistry* **7**(1): 68-74

Fotso S, Zabriskie TM, Proteau PJ, Flatt PM, Santosa DA, Mahmud T (2009) Limazepines A-F, pyrrolo[1,4]benzodiazepine Antibiotics from an Indonesian *Micrococcus* sp. *J Nat Prod* **72**(4): 690-695

Gerratana B (2012) Biosynthesis, synthesis, and biological activities of pyrrolobenzodiazepines. *Medicinal Research Reviews* **32**(2): 254-293

Giessen TW, Kraas FI, Marahiel MA (2011) A four-enzyme pathway for 3,5-dihydroxy-4-methylantranilic acid formation and incorporation into the antitumor antibiotic sibiromycin. *Biochemistry* **50**(25): 5680-5692

Gregson SJ, Howard PW, Barcella S, Nakamya A, Jenkins TC, Kelland LR, Thurston DE (2000a) Effect of C2/C3-endo unsaturation on the cytotoxicity and DNA-binding reactivity of pyrrolo 2,1-c 1,4 benzodiazepines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **10**(16): 1849-1851

Gregson SJ, Howard PW, Corcoran KE, Barcella S, Yasin MM, Hurst AA, Jenkins TC, Kelland LR, Thurston DE (2000b) Effect of C2-exo unsaturation on the cytotoxicity and DNA-binding reactivity of pyrrolo 2,1-c 1,4 benzodiazepines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **10**(16): 1845-1847

Hagstrom A, Pinhassi J, Zweifel UL (2000) Biogeographical diversity among marine bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology* **21**(3): 231-244

Harayama S, Kok M, Neidle EL (1992) Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu Rev Microbiol* **46**: 565-601

Hartley JA, Spanswick VJ, Brooks N, Clingen PH, McHugh PJ, Hochhauser D, Pedley RB, Kelland LR, Alley MC, Schultz R, Hollingshead MG, Schweikart KM, Tomaszewski JE, Sausville EA, Gregson SJ, Howard PW, Thurston DE (2004) SJG-136 (NSC 694501), a novel rationally designed DNA minor groove interstrand cross-linking agent with potent and broad spectrum antitumor activity: part 1: cellular pharmacology, in vitro and initial in vivo antitumor activity. In *Cancer Res.* **64**: 6693-6699

Herrmann KM, Weaver LM (1999) The shikimate pathway. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 473-503

Hochlowski JE, Andres WW, Theriault RJ, Jackson M, McAlpine JB (1987) Abbeymycin, a new anthramycin-type antibiotic produced by a streptomycete. *J Antibiot (Tokyo)* **40**(2): 145-148

Hoeksema H (1968) Celesticetin. V. The structure of celesticetin. *J Am Chem Soc* **90**(3): 755-757

Hofer I, Crusemann M, Radzom M, Geers B, Flachshaar D, Cai X, Zeeck A, Piel J (2011) Insights into the biosynthesis of hormaomycin, an exceptionally complex bacterial signaling metabolite. *Chem Biol* **18**(3): 381-391

Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Lydiate DJ, Smith CP, Ward JM, Schrempf H (1985) *Genetic Manipulation of Streptomyces; A Laboratory Manual*

Horwitz S (1971) Anthramycin. In *Proceedings of the Research Symposium on Complexes of Biologically Active Substances with Nucleic Acids and Their Modes of Action*, Hahn F. **2**(5): 40-47

Horwitz SB, Chang SC, Grollman AP, Borkovec AB (1971) Chemosterilant action of anthramycin: a proposed mechanism. *Science* **174**(4005): 159-161

Hu WP, Yu HS, Chen YC, Wang JJ (2003) Biological evaluation of an antibiotic DC-81-indole conjugate agent in human melanoma cell lines. In *Kaohsiung J Med Sci*. **19**: 1949-1956

Hu Y, Phelan V, Ntai I, Farnet CM, Zazopoulos E, Bachmann BO (2007) Benzodiazepine biosynthesis in *Streptomyces refuineus*. *Chemistry & Biology* **14**(6): 691-701

Hurley L, Thurston D (1984) Pyrrolo(1,4)benzodiazepine Antitumor Antibiotics: Chemistry, Interaction with DNA, and Biological Implications. *Pharmaceutical Research* **1**(2): 52-59

Hurley LH (1977) Pyrrolo(1,4)benzodiazepine antitumor antibiotics. Comparative aspects of anthramycin, tomaymycin and sibiromycin. *J Antibiot (Tokyo)* **30**(5): 349-370

Hurley LH (1980) Elucidation and formulation of novel biosynthetic pathways leading to the pyrrolo[1,4]benzodiazepine antibiotics anthramycin, tomaymycin, and sibiromycin. *Accounts of Chemical Research* **13**(8): 263-269

Hurley LH, Gairola C, Das NV (1976) Pyrrolo[1,4]benzodiazepine antibiotics. Biosynthesis of the antitumor antibiotic 11-demethyltomaymycin and its biologically inactive metabolite oxotomaymycin by *Streptomyces achromogenes*. *Biochemistry* **15**(17): 3760-3769

Hurley LH, Reck T, Thurston DE, Langley DR, Holden KG, Hertzberg RP, Hoover JR, Gallagher G, Jr., Faucette LF, Mong SM, *et al.* (1988) Pyrrolo[1,4]benzodiazepine antitumor antibiotics: relationship of DNA alkylation and sequence specificity to the biological activity of natural and synthetic compounds. *Chem Res Toxicol* **1**(5): 258-268

Ireton K, Gunther NWt, Grossman AD (1994) spo0J is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **176**(17): 5320-5329

Itoh J, Watabe H, Ishii S, Gomi S, Nagasawa M, Yamamoto H, Shomura T, Sezaki M, Kondo S (1988) Sibanomycin, a new pyrrolo[1,4]benzodiazepine antitumor antibiotic produced by a *Micromonospora* sp. *J Antibiot (Tokyo)* **41**(9): 1281-1284

Jackson PJ, James CH, Jenkins TC, Rahman KM, Thurston DE (2014) Computational studies support the role of the C7-sibirosamine sugar of the pyrrolobenzodiazepine (PBD) sibiromycin in transcription factor inhibition. *ACS Chem Biol* **9**(10): 2432-2440

Janata J, Kadlcik S, Koberska M, Ulanova D, Kamenik Z, Novak P, Kopecky J, Novotna J, Radojevic B, Plhackova K, Gazak R, Najmanova L (2015) Lincosamide synthetase-a unique condensation system combining elements of nonribosomal Peptide synthetase and mycothiol metabolism. In *PLoS One*.**10**

Jirásková, P; Kameník, Z; Gažák, R; Kadlčík, S; Radojevic, B; Steiningerová, L; Novotná, J; Kuzma, M; Najmanová, L; Janata, J (2015, v řízení): Biosynthesis of 4-Alkyl-L-proline Precursors of Lincomycin, Hormaomycin and Pyrrolobenzodiazepines: Can a γ -Glutamyltransferase Cleave the C-C Bond? *ACS Chemical Biology*

Junior FJ, Scotti L, Botelho SP, Da Silva MS, Scotti MT (2015) Benzo- and Thienobenzo-Diazepines: Multi-target Drugs for CNS Disorders. In *Mini Rev Med Chem*.

Kleinkauf H, von Dohren H (1990) Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. *Eur J Biochem* **192**(1): 1-15

Knochel T, Ivens A, Hester G, Gonzalez A, Bauerle R, Wilmanns M, Kirschner K, Jansonius JN (1999) The crystal structure of anthranilate synthase from *Sulfolobus solfataricus*: functional implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(17): 9479-9484

Koberska M, Kopecky J, Olsovska J, Jelinkova M, Ulanova D, Man P, Flieger M, Janata J (2008) Sequence analysis and heterologous expression of the lincomycin biosynthetic cluster of the type strain *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466. *Folia Microbiol.* **53**(5): 395-401

- Koběřská, M (2010): Komparativní analýza shluku genů pro biosyntézu linkomycinu a celesticetinu. Univerzita Karlova v Praze. Přírodovědecká fakulta. Katedra genetiky a mikrobiologie. Dizertační práce.
- Kohn KW, Glaubiger D, Spears CL (1974) The reaction of anthramycin with DNA. II. Studies of kinetics and mechanism. *Biochim Biophys Acta* **361**(3): 288-302
- Konishi M, Ohkuma H, Naruse N, Kawaguchi H (1984) Chicamycin, a new antitumor antibiotic. II. Structure determination of chicamycins A and B. *J Antibiot (Tokyo)* **37**(3): 200-206
- Kotecha M, Kluza J, Wells G, O'Hare CC, Forni C, Mantovani R, Howard PW, Morris P, Thurston DE, Hartley JA, Hochhauser D (2008) Inhibition of DNA binding of the NF-Y transcription factor by the pyrrolobenzodiazepine-polyamide conjugate GWL-78. *Mol Cancer Ther* **7**(5): 1319-1328
- Kumar R, Lown JW (2003) Recent developments in novel pyrrolo(2,1-c)(1,4)benzodiazepine conjugates: Synthesis and biological evaluation. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **3**(4): 323-339
- Kurnasov O, Goral V, Colabroy K, Gerdes S, Anantha S, Osterman A, Begley TP (2003) NAD biosynthesis: identification of the tryptophan to quinolinate pathway in bacteria. *Chem Biol* **10**(12): 1195-1204
- Lawson RJ, von Wachenfeldt C, Haq I, Perkins J, Munro AW (2004) Expression and characterization of the two flavodoxin proteins of *Bacillus subtilis*, YkuN and YkuP: biophysical properties and interactions with cytochrome P450 Biol. *Biochemistry* **43**(39): 12390-12409
- Lee PS, Lin DC, Moriya S, Grossman AD (2003) Effects of the chromosome partitioning protein Spo0J (ParB) on oriC positioning and replication initiation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **185**(4): 1326-1337
- Li W, Chou SC, Khullar A, Gerratana B (2009a) Cloning and Characterization of the Biosynthetic Gene Cluster for Tomaymycin, an SJG-136 Monomeric Analog. *Applied and Environmental Microbiology* **75**(9): 2958-2963
- Li W, Khullar A, Chou S, Sacramo A, Gerratana B (2009b) Biosynthesis of Sibiromycin, a Potent Antitumor Antibiotic. *Applied and Environmental Microbiology* **75**(9): 2869-2878

Lomovskaya N, Hong SK, Kim SU, Fonstein L, Furuya K, Hutchinson RC (1996) The *Streptomyces peucetius* *drnC* gene encodes a UvrA-like protein involved in daunorubicin resistance and production. *J Bacteriol* **178**(11): 3238-3245

Madigan MT, Martinko JM, Stahl D, Clark DP (2010) Brock Biology of Microorganisms, Benjamin Cummings, 13 edition

Marahiel MA, Stachelhaus T, Mootz HD (1997) Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. In *Chem Rev.* **97**: 2651-2674.

McDonald M, Mavrodi DV, Thomashow LS, Floss HG (2001) Phenazine biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*: branchpoint from the primary shikimate biosynthetic pathway and role of phenazine-1,6-dicarboxylic acid. *J Am Chem Soc* **123**(38): 9459-9460

Medema MH, Blin K, Cimermancic P, de Jager V, Zakrzewski P, Fischbach MA, Weber T, Takano E, Breitling R (2011) antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res* **39**:339-346

Mendes MV, Anton N, Martin JF, Aparicio JF (2005) Characterization of the polyene macrolide P450 epoxidase from *Streptomyces natalensis* that converts de-epoxypimaricin into pimaricin. *Biochem J* **386**: 57-62

Mohr N, Budzikiewicz H (1982) Tilivalline, a new pyrrolo[2, 1-c][1,4] benzodiazepine metabolite from *klebsiella*. *Tetrahedron* **38**(1): 147-152

Moody SC, Zhao B, Lei L, Nelson DR, Mullins JG, Waterman MR, Kelly SL, Lamb DC (2012) Investigating conservation of the albaflavenone biosynthetic pathway and CYP170 bifunctionality in streptomycetes. *Febs j* **279**(9): 1640-1649

Morollo AA, Bauerle R (1993) Characterization of composite aminodeoxyisochorismate synthase and aminodeoxyisochorismate lyase activities of anthranilate synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(21): 9983-9987

Najmanova L, Ulanova D, Jelinkova M, Kamenik Z, Kettnerova E, Koberska M, Gazak R, Radojevic B, Janata J (2014) Sequence analysis of porothramycin biosynthetic gene cluster. *Folia Microbiologica* **59**(6): 543-552

Napan KL, Zeng J, Takemoto JY, Zhan J (2012) A key cytochrome P450 hydroxylase in pradimicin biosynthesis. *Bioorg Med Chem Lett* **22**(1): 606-609

Novotna J, Honzatko A, Bednar P, Kopecky J, Janata J, Spizek J (2004) 1-3,4-Dihydroxyphenyl alanine-extradiol cleavage is followed by intramolecular cyclization in lincomycin biosynthesis. *Eur J Biochem* **271**(18): 3678-3683

Novotna J, Olsovska J, Novak P, Mojzes P, Chaloupkova R, Kamenik Z, Spizek J, Kutejova E, Mareckova M, Tichy P, Damborsky J, Janata J (2013) Lincomycin biosynthesis involves a tyrosine hydroxylating heme protein of an unusual enzyme family. *PLoS One* **8**(12)

Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Xia F, Stevens R (2014) The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res* **42**:206-214

Parker KA, Babine RE (1982) Revision of assignment of structure to the pyrrolodiazepinone antitumor antibiotic sibiromycin. *Journal of the American Chemical Society* **104**(25): 7330-7331

Peschke U, Schmidt H, Zhang HZ, Piepersberg W (1995) Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol Microbiol* **16**(6): 1137-1156

Petrusek RL, Anderson GL, Garner TF, Fannin QL, Kaplan DJ, Zimmer SG, Hurley LH (1981) Pyrrol[1,4]benzodiazepine antibiotics. Proposed structures and characteristics of the in vitro deoxyribonucleic acid adducts of anthramycin, tomaymycin, sibiromycin, and neothramycins A and B. *Biochemistry* **20**(5): 1111-1119

Phelan VV, Du Y, McLean JA, Bachmann BO (2009) Adenylation enzyme characterization using gamma γ -(18)O(4)-ATP pyrophosphate exchange. In *Chem Biol*. **16**: 473-478.

Puvvada MS, Forrow SA, Hartley JA, Stephenson P, Gibson I, Jenkins TC, Thurston DE (1997) Inhibition of bacteriophage T7 RNA polymerase in vitro transcription by DNA-binding pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepines. *Biochemistry* **36**(9): 2478-2484

- Rydon HN (1948) Anthranilic acid as an intermediate in the biosynthesis of tryptophan by *Bact. typhosum*. *Br J Exp Pathol* **29**(1): 48-57
- Saha S, Li W, Gerratana B, Rokita SE (2015) Identification of the dioxygenase-generated intermediate formed during biosynthesis of the dihydropyrrole moiety common to anthramycin and sibiromycin. *Bioorg Med Chem* **23**(3): 449-454
- Schneditz G, Rentner J, Roier S, Pletz J, Herzog KA, Bucker R, Troeger H, Schild S, Weber H, Breinbauer R, Gorkiewicz G, Hogenauer C, Zechner EL (2014) Enterotoxicity of a nonribosomal peptide causes antibiotic-associated colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(36): 13181-13186
- Schneemann I, Wiese J, Kunz AL, Imhoff JF (2011) Genetic approach for the fast discovery of phenazine producing bacteria. *Mar Drugs* **9**(5): 772-789
- Stachelhaus T, Mootz HD, Marahiel MA (1999) The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **6**(8): 493-505
- Sundlov JA, Garringer JA, Carney JM, Reger AS, Drake EJ, Duax WL, Gulick AM (2006) Determination of the crystal structure of EntA, a 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoic acid dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**(7): 734-740
- Taylor M, Lamb DC, Cannell R, Dawson M, Kelly SL (1999) Cytochrome P450105D1 (CYP105D1) from *Streptomyces griseus*: heterologous expression, activity, and activation effects of multiple xenobiotics. *Biochem Biophys Res Commun* **263**(3): 838-842
- Tendler MD, Korman S (1963) Refuin- a non-cytotoxic carcinostatic compound proliferated by a thermophilic actinomycete. *Nature* **199**(489): 501
- Thurston DE, Bose DS, Howard PW, Jenkins TC, Leoni A, Baraldi PG, Guiotto A, Cacciari B, Kelland LR, Foloppe MP, Rault S (1999) Effect of A-ring modifications on the DNA-binding behavior and cytotoxicity of pyrrolo 2,1-c 1,4 benzodiazepines. *Journal of Medicinal Chemistry* **42**(11): 1951-1964

Thurston DE, Bose DS, Thompson AS, Howard PW, Leoni A, Croker SJ, Jenkins TC, Neidle S, Hartley JA, Hurley LH (1996) Synthesis of Sequence-Selective C8-Linked Pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine DNA Interstrand Cross-Linking Agents. In *J Org Chem* **61**:8141-8147

Tsunakawa M, Kamei H, Konishi M, Miyaki T, Oki T, Kawaguchi H (1988) POROTHRAMYCIN, A NEW ANTIBIOTIC OF THE ANTHRAMYCIN GROUP - PRODUCTION, ISOLATION, STRUCTURE AND BIOLOGICAL-ACTIVITY. *Journal of Antibiotics* **41**(10): 1366-1373

Vachalova K, Felsberg J, Petricek M, Spizek J, Tichy P (1995) Copy number determination of different derivatives of the streptomycete mini-plasmid pSLG33. *Folia Microbiologica* **40**(3): 231-237

Van Houten B, Croteau DL, DellaVecchia MJ, Wang H, Kisker C (2005) 'Close-fitting sleeves': DNA damage recognition by the UvrABC nuclease system. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **577**(1–2): 92-117

Weber T, Blin K, Duddela S, Krug D, Kim HU, Bruccoleri R, Lee SY, Fischbach MA, Muller R, Wohlleben W, Breitling R, Takano E, Medema MH (2015) antiSMASH 3.0-a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res*

Whiteley CG, Lee DJ (2015) Bacterial diguanylate cyclases: structure, function and mechanism in exopolysaccharide biofilm development. *Biotechnol Adv* **33**(1): 124-141

Witz DF, Hessler EJ, Miller TL (1971) Bioconversion of tyrosine into the propylhygric acid moiety of lincomycin. *Biochemistry* **10**(7): 1128-1133

Yonemoto IT, Li W, Khullar A, Reixach N, Gerratana B (2012) Mutasynthesis of a potent anticancer sibiromycin analogue. *ACS Chem Biol* **7**(6): 973-977

Young IG, Gibson F (1969) Regulation of the enzymes involved in the biosynthesis of 2,3-dihydroxybenzoic acid in *Aerobacter aerogenes* and *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **177**(3): 401-411

Zalkin H, Smith JL (1998) Enzymes utilizing glutamine as an amide donor. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **72**: 87-144